

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



**UTILIDAD DE LA DETECCIÓN POR PCR EN
TIEMPO REAL EN EL DIAGNÓSTICO PRECOZ
DE LA INFECCIÓN FÚNGICA INVASIVA EN EL
PACIENTE ONCOHEMATOLÓGICO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Yolanda Meije Castillo

Bajo la dirección de los doctores

J.M. Aguado García
M. Cuenca Estrella

Madrid, 2010

- ISBN: 978-84-693-3226-9

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina



**Utilidad de la Detección por PCR en
Tiempo Real en el Diagnóstico
Precoz de la Infección Fúngica
Invasiva en el Paciente
Oncohematológico**

Tesis Doctoral

Yolanda Meije Castillo

Directores de Tesis: J.M. Aguado García
M. Cuenca Estrella

Madrid 2009

Hay otros mundos, pero están en éste

Paul Éluard

A mi madre y a mi hermana

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y a mi hermana, si están ellas todos es fácil, todo es posible.

A mi madre Inma, la persona más optimista que conozco y con mayor fortaleza, siempre contenta, una simple frase de ella y todo adquiere color, el mundo es más bonito, un mundo que ella ha creado para mí desde que nací, gracias por ser mi madre, no podría haber tenido una mejor. Eres la persona que más admiro en el mundo, una artista increíble y mi mejor amiga.

A mi hermana Ruth, la persona que mejor escucha del mundo, con esa carita tan dulce, eres la mejor persona que conozco, la más inteligente y la persona más especial que hay en el mundo, eres un auténtico regalo en mi vida, gracias por siempre estar ahí y por ser tan auténtica. Te quiero mucho.

A mi padre César, siempre ha habido una conexión especial entre los dos, me ha apoyado en todo a lo largo de mi vida, siempre he admirado su carisma, el enseñarme a ser una buena persona y a reírme de mí misma, de pequeña me explicaba lo que no entendía en los estudios y aún hoy me ha ayudado con las gráficas de esta tesis y con toda su edición. Gracias por todo lo que siempre me has dado y por quererme tanto.

A mi abuelita Carmen, todo lo que siempre me diste fue amor y cariño incondicional y el legado de tu arte en la pintura.

A mi padrino Camilo, te siento muchas veces y se que me cuidas ahí donde estés, tu sonrisa y valentía ante la vida y la muerte están siempre presentes en mi día a día.

A David, todo amor, todo dulzura, todo arte. La danza eres tú, transmites tanta serenidad y fuerza al mismo tiempo, que te convierte en un ser especial, único, bohemio, con el que me encanta vivir la vida, apareciste como un mago y fue como abrir la ventana y que llegara un torbellino suave que me transporta por un mundo donde todo es precioso. Te quiero mucho. Gracias por todo, por siempre estar ahí, por tu amor y apoyo constante.

A Juan Diego, has sido muy importante en mi vida, juntos aprendimos mil cosas y apoyaste con inmenso cariño y paciencia todo mi inicio en la práctica médica, independientemente de que nuestras vidas se separaran, siempre formarás parte de lo que soy.

A Mar y Cristina mis mejores amigas y las chicas que más admiro, ambas están llenas de fortaleza, optimismo y alegría, ambas tan inteligentes y con una personalidad tan marcada. Han sido cruciales en los momentos duros de mi vida y en los momentos más bonitos. Gracias por todo lo que me habéis enseñado, por vuestro apoyo único. Con Mar además de mil viajes, comparto el amor por las infecciosas y su apoyo en este campo ha sido único. Con Cristina compartí la experiencia de Camerún y lo que nos cambió.

A Ohio y Pablo mis mejores amigos, mi droga. Los dos de forma completamente distinta me han mostrado las diferentes caras de la vida, del mundo y de la convivencia y las relaciones entre hombres y mujeres.

A Frank y Michiel grandes amores de mi vida.

A Vicente porque siempre nos quedará Sevilla.

A “Mar el poder del mar” y tantas canciones...por volar conmigo, por hacerme sentir viva, enamorada, por hacer mi vida aún más bonita.

A Ana, sin ti esta tesis, esta aventura en las infecciosas, esta etapa de mi vida no hubiera sido posible, has aparecido en mi vida no hace mucho y me parece que siempre hubieras estado ahí, quizá por tu ánimo, tu ilusión, tu energía, eres inigualable, un ejemplo para mí, una persona llena de optimismo y de alegría, trabajadora y excelente persona. No cambies nunca. Gracias por todo Ana, por escucharme, ser tan buena amiga y compañera.

A Antonio, una persona crucial en mi inicio en esta aventura, el destino nos cruzó y a raíz de ello aquí empecé. Tu apoyo desde el principio ha sido inmensamente generoso como tú, un compañero increíble y mejor amigo. Un médico al que admiro como profesional y como persona, siempre he podido contar contigo y me has ayudado en esta tesis y sobre todo, a reírme en los momentos complicados. Eres realmente genial.

A Carmen, ella hubiera sido la tercera directora de esta tesis, una persona realmente importante en mi llegada al 12 de Octubre, con su apoyo como coordinadora de Urgencias y sus palabras siempre de ánimo e ilusión haciéndome sentir como en casa. Eres una trabajadora incansable y la persona más graciosa que conozco, pero ante todo, una buena persona. Sus datos, todas sus explicaciones y el inicio de orientación de esta tesis fueron cruciales y sin ello, esta tesis nunca se hubiera podido realizar. Carmen eres maravillosa.

Hay tres hospitales que van unidos a mi vida, el Hospital Universitario de Guadalajara, donde me formé como internista, el Hospital Ramón y Cajal donde roté en infecciosas y estuve con una beca de R4 y como no, el Hospital 12 de Octubre donde he iniciado mi formación en Infecciosas.

Mi experiencia en el Hospital de Guadalajara fue preciosa, la gente de allí y los pacientes son gente excepcional. Quería agradecer en primer lugar a mi CoR Moisés el ser tan buen amigo y compañero, lo que nos hemos reído juntos y aprendido nunca lo olvidaré, ha sido un regalo tenerlo. Quería destacar a mi amiga Sara, la mejor R mayor que pude tener, de ella aprendí lo que no está escrito y aún guardo apuntes de esa época, se ha convertido por otra parte en una de mis mejores amigas y una persona a la que quiero montón y que me ha ayudado en momentos duros de mi vida. También aprendí y disfruté la medicina con Javier Alberdi, mi R mayor, él me enseñó a saber mirarle la cara al paciente, su amor e ilusión por la cooperación es impresionante, una persona inigualable. También quería dedicar esta tesis a mi compañera Pilar con la que me quedaba despierta en las guardias de R1 para estar juntas y con la que tantas noches tuvimos miles de anécdotas, eres una amiga excelente y una médica ejemplar. A mi gran amiga Anabel, en la UCI nació nuestra bonita amistad, una persona sumamente optimista y alegre y una médica excelente. Por último, a mis buenos amigos y compañeros, Esteban y Arancha habéis sido como mis padres en la Medicina Interna, unos amigos ejemplares, unos médicos admirables y unas personas maravillosas.

Mis jefes en Guadalajara fueron Julio de la Morena, una persona que siempre se interesó por nosotros y nos cuidó. En un momento me tocó por casualidad ser su médico, fue una experiencia graciosa y un honor. Por otro lado Manuel Rodríguez Zapata, un jefe maravilloso, una persona con carisma que siempre te hacía sentir bien y te mostraba su cariño, de él aprendí sobre todo a sentarme en la cama del paciente y escucharle, aprendí el valor de la historia clínica. Zapata es un médico increíble y una persona a la que admiro mucho.

Mis otros adjuntos fueron Lorenzo Sánchez, el médico que cualquiera de nosotros querría ser, si en mi vida llego a ser la mitad que él ya estaré contenta. Miguel Torralba, destacar de Miguel que siempre me ayudó a manejar todos los pacientes que me quería ingresar porque eran de infecciosas, él me inició en la estadística y la investigación y he aprendido mucho de él, una persona extremadamente generosa.

Agradecer también el cariño constante de Pedro Horcajo y el aprendizaje de mano de Manuel Pérez Nicolás y de Javier Mateos. También quería agradecer todo lo que aprendí y lo a gusto que estuve siempre con Enrique Novo, Juan Ramón la Rubia, Antonio Albaya, Antonio Yusta y Antonio Bienvenido (*in memoriam*). En especial a Florencio García su docencia y su amistad, una persona única, el destino no has reencontrado en el 12, esto ha sido una suerte y un apoyo impresionante para mí, sus conversaciones son un bálsamo en mi día a día.

Mis resis pequeños fueron excepcionales, agradecer a Jero, Javier, Asún, Rosa, Ismael y María José su cariño.

En el Hospital Ramón y Cajal comencé a amar las infecciosas con la gente estupenda y excelentes profesionales que hay allí "capitaneados" por Santiago Moreno, el jefe que siempre quise tener, una mente privilegiada y una persona que se preocupa por su equipo a todos los niveles.

Agradecer a Rogelio López-Vélez sus conversaciones sobre la vida y la medicina en aquel despacho cada día, una persona que ante todo hace crecer a los que tiene a su lado, un comunicador nato y una persona que transmite entusiasmo.

A Pepe Casado y Susi Pérez Elías, por todo lo que aprendí en el VIH y lo bien que lo pasé con ellos en la consulta. De Pepe además aprendí en las guardias lo que significa ser un especialista.

A Javier Cobo por ser un excelente docente, por cuidarme, transmitirme su entusiasmo y por enseñarme tantas cosas.

A Vicente Pintado porque mi primera y mi última guardia allí fue con él y entremedias aprendí a ser infectóloga y a querer a los pacientes, me encantaban siempre sus charlas, como aquella sobre la pancreatitis el primer día que llegué allí y el cariño con el que siempre me trató y me trata, sin duda Vicente es un gran amigo para mí, una persona importante en mi vida, que siempre me demuestra su apoyo.

Por último y las dos personas más importantes en mi formación y en mi futuro en las Infecciosas han sido Jesús Fortun y Pilar Martín Dávila, nunca podré agradecerlos lo suficiente, todo lo que me habéis apoyado, vuestro enorme cariño y la ilusión que me habéis transmitido. Los dos sois la clase de médicos que yo querría ser, un ejemplo de constancia en el trabajo, de excelentes profesionales y de una calidad humana impresionante. Todo lo hacéis con un cariño y una ilusión envidiable sabiendo unir la investigación a la

práctica clínica. Mi experiencia y aprendizaje con vosotros ha sido un regalo y el haber apoyado mi camino en este mundo y mi inicio en el 12 de Octubre una suerte. De Pilar además decir que se ha convertido en una gran amiga para mí y una persona a la que quiero mucho y que siempre me ha escuchado, animado y ayudado. Ella me ayudó también con las gráficas de esta tesis.

Quería agradecer igualmente esta tesis a Manolo Cuenca, mi director de tesis junto con José María Aguado, una persona que desde el primer día que le vi me cayó genial, una persona sumamente inteligente y con una alegría y optimismo que hace que todo sea más fácil, trabajar con él es un gusto y un lujo. Me ha ayudado en todo momento y siempre ha estado dispuesto a ofrecerme su sabiduría, sus explicaciones, su trabajo y su cariño. Gracias Manolo eres una persona excepcional.

Por último, mi aventura en las Infecciosas ha llegado de la mano de José María Aguado en el hospital 12 de Octubre. Un hospital maravilloso que me ha acogido desde el principio, con profesionales excelentes y humildes, cualidad que todo médico debería tener. Los residentes me enseñan diariamente y muchos son buenos amigos míos, destacar a David, Ismael, Laura e Irene su cariño continuo. Gracias también a mis compis de Urgencias, en especial a Jara, al Servicio de Hematología, al Servicio de Microbiología y a Alicia del Instituto Nacional Carlos III.

José María Aguado mi jefe, mi director de tesis y la persona que me dio la oportunidad de estar en esta maravillosa Unidad de Infecciosas, era para mí un nombre que yo veía en artículos y libros y una persona que me encantaba escuchar cuando daba alguna charla, si me dijeran que iba a haber trabajado con él nunca lo hubiera creído, era un sueño para mí. De su mano he aprendido lo que es trabajar sin parar, lo que es aprender sin parar y lo que es investigar sin parar, nunca pensé que el tiempo diera para tanto y al mismo tiempo nunca pensé que yo misma diera para tanto, me ha hecho conocerme y ver de lo que soy capaz. Desde el primer día he sentido su cariño y ha sido un aprendizaje inmenso en todos los sentidos. Una persona que con una Unidad pequeña esta a un nivel altísimo en el mundo de las Infecciosas de este país, un privilegio trabajar con él. Gracias José María por esta tesis, un regalo para mí y por la maravillosa oportunidad que he vivido contigo, un sueño hecho realidad.

En esta unidad hay además tres personas inigualables. Mi gran amigo, cómplice y excelente persona Manolo Lizasoain, cuando él comienza a contar un paciente y hace un diagnóstico diferencial, es como una clase magistral, todo es silencio alrededor, es como si algo muy importante estuviera pasando, el mundo se para. Eres la persona con más elegancia y carisma que conozco. Manolo, gracias por todo, por ser como eres, por tu amistad y tu cariño, por tantas y tantas conversaciones. Porque eres maravilloso y porque esta tesis es obra tuya también, has sido codirector junto a José María Aguado y Manolo Cuenca, aportando tu sabiduría en tantas reuniones y tu ayuda constante con esta tesis.

Francisco López Medrano, detrás de una persona que yo veía como tímida hay una de las mejores personas que yo he conocido en mi vida. Un excelente médico con mayúsculas, preocupado por sus pacientes hasta en el último detalle, un profesional de los pies a la cabeza y una persona admirable, trabajadora, constante y maravillosa. Es un lujo estar contigo, gracias por ser así y por todo lo que me has enseñado y apoyado siempre. Te tengo un cariño inmenso.

Rafa San Juan, contigo fueron mis comienzos y contigo adquirí todos mis primeros conocimientos, eres una persona que haces sentir válido al que esta contigo, que le gusta dar docencia y ayudar. Siempre esta dispuesto a explicarte, ayudarte y ofrecer generosamente su tiempo en cualquier problema que tengas, casi siempre de estadística. Una persona entusiasta, con ganas de hacer cosas y que todos participen. Gracias por todo lo que me has enseñado y por tu cariño constante. Siempre me sorprendió como eres capaz de tomar las riendas y asumir la responsabilidad cuando ha habido cualquier problema en la unidad, como aquel día, el más duro probablemente para todos nosotros, en que perdimos a nuestra compañera.

Y a ella, a Sagrario quería acabar dedicando esta tesis, eras una persona seria que escondía un corazón enorme, que adoraba la medicina y aprender, una excelente compañera, cariñosa y maravillosa, además de enormemente graciosa cuando perdía su timidez. Fue un lujo conocerte y haber compartido contigo nuestra ilusión y amor por las Infecciosas. Durante un tiempo fuimos las tres mosqueteras y siempre será así en el corazón de Ana y mío. Sólo espero, que parte de ti esté en mí cada vez que cuide de un paciente.

A ellos, los pacientes y en especial al paciente oncohematológico va dedicada igualmente esta tesis, por enseñarnos en su valentía diaria y su optimismo incesante a disfrutar en el día a día de la vida que tenemos.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
Importancia de la infección fúngica invasiva (IFI) en el paciente oncohematológico.....	1
¿Cuáles son los factores de riesgo de IFI en el paciente oncohematológico?.....	3
• Situación inmunológica del huésped.....	3
• Importancia de la neutropenia	7
• Importancia de las nuevas terapias biológicas.....	9
• El papel de los corticoesteroides	11
• Nuevas modalidades de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH).....	13
Prevalencia y mortalidad de la IFI en el paciente oncohematológico	16
<i>Aspergillus fumigatus</i>	18
Diagnóstico de la aspergilosis invasiva (AI)	22
• Introducción	22
• Rentabilidad de los cultivos microbiológicos convencionales en el diagnóstico de AI en pacientes hematológicos	23
Técnicas de diagnóstico alternativas al cultivo para la detección de la AI	24
• Aportación del TACAR en el diagnóstico precoz de la AI	24
• Detección de antígenos fúngicos en el diagnóstico de AI. Galactomanano y 1-3 β -D Glucano	26
• Galactomanano	26
• 1-3 β -D Glucano.....	35
• Estudios comparativos betaglucano y galactomanano.	38

Técnicas moleculares para el diagnóstico de la AI. Determinación de ADN fúngico mediante la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR).....	39
HIPÓTEIS PRINCIPAL	47
HIPÓTESIS SECUNDARIAS	47
OBJETIVOS.....	48
MATERIAL Y MÉTODOS	49
Población de estudio.....	49
Definición de los episodios de riesgo.....	50
Determinación de GM	51
Determinación de PCR	52
• Técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (PCR-TR)	52
Tomografía axial computerizada de alta resolución (TACAR).....	54
Pruebas invasivas	55
Seguimiento clínico.....	55
Pautas de profilaxis.....	56
Tratamiento antifúngico	57
Definiciones	57
• Aspergilosis invasiva	57
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
RESULTADOS.....	61
Pacientes	61
GRÁFICOS DE LOS PACIENTES CON AI y PCR positiva.....	63
• Paciente 1	63
• Paciente 2	67

• Paciente 3	69
• Paciente 4	71
• Paciente 5	75
• Paciente 6	77
• Paciente 7	81
• Paciente 8	84
• Paciente 9	88
• Paciente 10	92
• Paciente 11	93
• Paciente 12	95
Resultados de la técnica de PCR	99
Análisis CART	100
Análisis de la precocidad diagnóstica	101
DISCUSIÓN	106
CONCLUSIONES	114
PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS	115
BIBLIOGRAFÍA	116

ÍNDICE DE IMÁGENES Y FIGURAS

Imagen 1: <i>Aspergillus fumigatus</i>	20
Imagen 2: <i>Aspergillus fumigatus</i>	21
Imagen 3: <i>Aspergillus fumigatus</i>	21
Figura 1: Curvas ROC y datos estadísticos en relación a los resultados obtenidos con la técnica de PCR y GM.	104
Figura 2: Modelo obtenido mediante análisis CART con dos o más resultados de PCR y GM positivo.	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.- Defecto inmunitario y riesgo de infección.....	3
Tabla II.- Categorización por riesgo de neutropenia febril	8
Tabla III Principales estudios de GM incluidos en el meta-análisis de diagnóstico de AI en el paciente oncohematológico (de 1995 al 2005).....	29
Tabla IV. Principales estudios de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la determinación de GM por ELISA Platelia en sangre en pacientes oncohematológicos desde el 2006 a la actualidad.	32
Tabla V. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la determinación de 1-3 B-D glucano en el diagnóstico de IFI	37
Tabla VI. Estudio en 82 pacientes con IFI.	39
Tabla VII. Principales estudios prospectivos de la utilidad de la PCR para el diagnóstico de IFI en pacientes oncohematológicos	43
Tabla VIII. Clasificación de los episodios según el riesgo de AI.....	51
Tabla IX. Criterios EORTC-MSG para el diagnóstico de la AI.....	59
Tabla X. Datos demográficos, radiológicos y microbiológicos de los pacientes con AI.....	62
Tabla XI. Resultados de la técnica de PCR-TR	103

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

AC	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Aspergilosis invasora
AnfoB	Anfotericina B liposomal
BG	1-3 β glucano
BTB	Biopsia transbronquial
Caspo	Caspofungina
CMV	Citomegalovirus
DO	Densidad óptica
E	Especificidad
EICH	Enfermedad injerto contra huésped
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
F	Fluconazol
FDA	Food and Drugs Administration
GM	Galactomanano
HLA	Antígenos de histocompatibilidad
IFI	Infección fúngica invasiva
I	Itraconazol
LA	Leucemia aguda
LBA	Lavado broncoalveolar

LCR	Líquido ceforraquídeo
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfática crónica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LNH	Linfoma no Hodking
MM	Mieloma múltiple
OR	Odds ratio
PAAF	Punción-aspiración con aguja fina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-TR	PCR en tiempo real
Rx	Radiología convencional
S	Sensibilidad
SMD	Síndrome mielodisplásico
SNC	Sistema nervioso central
TAC	Tomografía axial computerizada
TACAR	TAC de tórax de alta resolución
Th	T-helper
TLR	Toll-receptor
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
Vori	Voriconazol
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

INTRODUCCIÓN

El objetivo de esta tesis es valorar el uso de una técnica diagnóstica basada en la PCR en tiempo real (PCR-TR) para la detección de *Aspergillus fumigatus* en el diagnóstico de aspergilosis invasiva (AI) en el paciente oncohematológico.

Importancia de la infección fúngica invasiva (IFI) en el paciente oncohematológico.

La infección fúngica es una de las primeras causas de mortalidad y morbilidad en el paciente oncohematológico. Esta infección es además, el mayor obstáculo para obtener buenos resultados en el tratamiento de la patología hematológica maligna.

La mortalidad por infección bacteriana se ha reducido notablemente gracias a la disponibilidad de antibióticos de amplio espectro, cada vez más efectivos, y a su empleo empírico precoz en pacientes con neutropenia febril (1).

Así mismo, la infección por citomegalovirus (CMV) también ha presentado un descenso en su mortalidad en pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos, gracias a los avances en los métodos diagnósticos y en la profilaxis y el tratamiento de dicha infección (2).

Por todo ello, las infecciones fúngicas invasivas (IFI) constituyen en la actualidad, la principal causa de morbi-mortalidad por infección en pacientes hematológicos, mayormente en pacientes con neutropenia inducida por quimioterapia y en pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) (3).

De hecho, en la segunda mitad del siglo XX, la prevalencia de IFI ha aumentado constantemente, debido al mayor número de pacientes inmunodeprimidos y a la generalización de agresivas prácticas diagnósticas y terapéuticas. Actualmente

entre un 10-50% de los pacientes hematológicos con neutropenia o receptores de un trasplante de médula ósea, tienen un episodio de IFI durante la evolución de su enfermedad. *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. son las especies que causan un mayor número de estas infecciones (4). En un estudio observacional, prospectivo, multicéntrico reciente desarrollado en 234 pacientes sometidos a trasplante de médula ósea con IFI, la aspergillosis invasiva (AI) fue la causa más frecuente (59.2%), seguida de la candidiasis invasiva (24.8%) y la zigomicosis (7.2%) (5) .

En los últimos años, las tasas de infección y mortalidad asociada a *Candida* spp. han disminuido de forma evidente por el uso de profilaxis y por la utilización de tratamientos empíricos en enfermos con neutropenia febril. Sin embargo, estos descensos no han sido tan acusados en las infecciones por *Aspergillus* spp. y en otras micosis. La mortalidad por AI en pacientes hematológicos continúa siendo muy alta (60-90%), sobretodo en el seno de la neutropenia y en el TPH (6).

Entre los agentes etiológicos causantes de IFI en el paciente oncohematológico, la *Candida* spp. y el *Aspergillus* spp. son los principales responsables como hemos dicho, sin embargo, a esta situación hay que añadir el aumento constante de la lista de hongos patógenos que un laboratorio debe ser capaz de identificar. Además, muchos de estos hongos, muestran una sensibilidad impredecible a los antifúngicos convencionales, con casos de resistencia a la anfotericina B, equinocandinas y otros antifúngicos. En algunos casos, la mortalidad de las infecciones invasoras por estas especies emergentes se aproxima al 100%.

Así, *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. están seguidos, aunque a mucha distancia en la lista etiológica de IFI del paciente oncohematológico, por otros hongos hialinos segmentados del género *Fusarium*, *Acremonium* y *Paecilomyces*, hongos dematiáceos de los géneros *Exophiala*, *Scedosporium*, *Bipolaris* y *Alternaria*, hongos no septados como los zigomicetos y otros hongos levaduriformes entre los que se incluyen *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Malassezia* y *Rhodotorula*.

¿Cuáles son los factores de riesgo de IFI en el paciente oncohematológico?

Situación inmunológica del huésped

Los pacientes con cáncer están sometidos a distintos tipos de inmunodeficiencia como consecuencia de la propia enfermedad de base y de su tratamiento. Esta inmunodeficiencia afecta a más de un mecanismo de defensa y variará a lo largo del tiempo. Esto implica cambios en cuanto al riesgo de infección, tanto en el tipo, como en lo referente a la incidencia y gravedad.

El desarrollo de infección es consecuencia del desequilibrio entre los mecanismos de virulencia del agente infeccioso y los mecanismos de defensa del organismo afecto, a favor del primero.

El organismo dispone de mecanismos de defensa generales (barreras cutáneo-mucosas, neutrófilos, etc...) y específicos. Dependiendo del tipo de mecanismo alterado se generará un tipo de riesgo para determinadas infecciones (7).(Tabla I).

Tabla I.- Defecto inmunitario y riesgo de infección (Adaptada de M Lizasoain et al)

Neutropenia	<p>Bacterias</p> <ul style="list-style-type: none">-Cocos gram +<ul style="list-style-type: none">· <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa· <i>Staphylococcus aureus</i>· <i>Streptococcus viridans</i>· <i>Enterococcus</i> spp.-Bacilos gram –<ul style="list-style-type: none">· Enterobacterias· <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <p>Hongos</p> <ul style="list-style-type: none">-<i>Candida</i> spp.-<i>Aspergillus</i> spp.-<i>Fusarium</i> spp.
-------------	---

Inmunidad celular	Bacterias - <i>Listeria</i> - <i>Nocardia</i> Micobacterias Hongos - <i>Pneumocystis jirovecii</i> - <i>Aspergillus</i> spp. - <i>Cryptococcus neoformans</i> Virus - <i>Herpesvirus</i> - <i>Virus respiratorios</i> - <i>Adenovirus</i> Protozoos - <i>Toxoplasma gondii</i>
Inmunidad humoral	Bacterias - <i>Streptococcus pneumoniae</i> - <i>Haemophilus influenzae</i>
Esplenectomía, asplenia funcional	Bacterias - <i>Streptococcus pneumoniae</i> - <i>Haemophilus influenzae</i> - <i>Neisseria meningitidis</i> - <i>Capnocytophaga</i> spp. Otros - <i>Babesia</i>
Alteración barreras - Piel / Catéter - Mucosas	Bacterias - <i>Staphylococcus coagulasa</i> – - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Corynebacterium</i> spp. - <i>Bacillus</i> spp. - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Acinetobacter</i> spp. Hongos - <i>Candida</i> - <i>Mucormycosis</i> Bacterias - <i>Streptococcus viridans</i> - <i>Enterococcus</i> spp. - <i>Capnocytophaga canimorsus</i> Hongos - <i>Candida</i> spp. Virus - <i>Virus Herpes simples</i>

Los neutrófilos y los macrófagos son la primera línea de defensa innata frente a la aspergilosis, aunque cada vez es más evidente la importancia de una adecuada respuesta celular T para el adecuado control de la enfermedad (8).

Específicamente los macrófagos alveolares ingieren y eliminan las conidias mientras que los neutrófilos y los monocitos son fungicidas frente a las hifas (9, 10). Es probable que los neutrófilos interactúen para generar una respuesta adaptativa *T-helper* (Th). La respuesta Th se divide ampliamente en dos categorías dependiendo de la producción de citoquinas.

La respuesta tipo 1 (Th1) se caracteriza por una elevación de las citoquinas proinflamatorias (gamma interferón, factor de necrosis tumoral, interleukina 2 (IL-2) e IL- 1), lo que se asocia a un aumento de la función fagocítica esencial para la eliminación de las hifas. La respuesta tipo 2 (Th2) se caracteriza por el incremento de las citoquinas (IL- 4, IL- 5 e IL-10) que estimulan la función de mastocitos y eosinófilos y suprimen la actividad fagocítica de los neutrófilos y los macrófagos.

En estudios animales se ha sugerido que la disregulación de la respuesta Th, con un predominio de la Th2, contribuye a un mal pronóstico de la AI (11) y que la administración de citoquinas asociadas a la respuesta Th1 puede proteger a los ratones del desarrollo de AI (12).

Estos efectos beneficiosos de las citoquinas de la respuesta Th1 también se ha demostrado en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (13). Recientemente, se ha comunicado que enfermos con AI no neutropénicos con niveles de interleukina-10 indetectable tienen una evolución más favorable y que los incrementos de la IL-10 se asocian a progresión de la enfermedad independientemente del tratamiento antifúngico (14).

Por otra parte, *Aspergillus* spp. parece que activa la inmunidad celular innata a través de los receptores *Toll* (TLR) 2 y 4 (proteínas de transmembrana existentes en la superficie de las células inmunes que reconocen diferentes organismos). Polimorfismos o alteraciones en los genes TLR se han asociado con una mayor susceptibilidad para diferentes infecciones. En un estudio reciente se ha visto que la presencia del haplotipo S4 para el TLR 4 en el donante, se relaciona, de forma

estadísticamente significativa, con un mayor riesgo de AI en pacientes sometidos a TPH alogénico de donante no emparentado (15)

En los pacientes con cáncer, tanto por la enfermedad como por el tratamiento, se va a producir una alteración de los distintos mecanismos de defensa. Éstos nunca van a estar alterados de forma aislada, sino que siempre habrá una combinación de déficits inmunitarios dependientes, como se ha dicho, de la enfermedad subyacente y del tratamiento utilizado. Estos déficits inmunitarios además, van a variar según el tipo y grado de inmunodeficiencia a lo largo del tiempo.

La relación con el tipo de enfermedad de base se hace más evidente al considerar la diferencia de riesgo en cuanto a incidencia, tipo y gravedad de infecciones encontrada entre los pacientes con leucemia y linfoma con respecto al resto de tumores sólidos. Así, en el conocido como paciente oncohematológico, que es en el que se focaliza el estudio de esta tesis, la población celular neoplásica reside por definición dentro del sistema inmune y las células residuales estarán expuestas a una quimioterapia agresiva lo que conlleva un grado de inmunodeficiencia mucho mayor.

La variación en cuanto al tiempo se hace muy evidente en pacientes sometidos a TPH. El período de riesgo inicial se resuelve con la regeneración medular y la reparación de las barreras cutáneo-mucosas. Sin embargo, persisten déficits inmunológicos tanto de tipo humoral como celular hasta la reconstitución inmune completa que se alcanza en un período de tiempo variable (hasta 2 años) dependiendo, por ejemplo, del desarrollo de enfermedad injerto contra huésped (EICH) (7).

Las diferencias en cuanto al tipo de infección según el tiempo no sólo van a depender del tipo de inmunodeficiencia sino de lo que dure ésta y así, los microorganismos infectantes pueden variar en la fase precoz de la neutropenia o en el seno de una neutropenia profunda y prolongada.

Importancia de la neutropenia

Asumiendo la presencia de una inmunodeficiencia múltiple y cambiante en el paciente oncohematológico, el descenso de neutrófilos o neutropenia es uno de los principales factores de riesgo de IFI, por lo que es útil revisar este concepto y el de la neutropenia febril.

Todos los fármacos citotóxicos usados en el tratamiento del cáncer alteran la proliferación de las células hematopoyéticas. Así, después de la destrucción del *pool* mitótico y de la depleción del *pool* de reserva medular sobreviene la neutropenia. Además, tanto la quimioterapia como la radioterapia interfieren en la función de los neutrófilos.

La neutropenia (y la disfunción de los neutrófilos) es el factor de riesgo más importante para la infección en general y para la IFI en los pacientes con cáncer, y será uno de los factores en el que centraremos la atención de esta tesis.

Definimos neutropenia como un recuento de neutrófilos inferior a 500/ μ l o una cifra <1000/ μ l si se prevé una caída a <500/ μ l en las 48 horas siguientes a la evaluación. Neutropenia profunda es un recuento por debajo de 100 – 200/ μ l (16).

El riesgo de infección va a depender del grado de neutropenia, de la rapidez de instauración y de la duración (17). El grado y duración de dicha neutropenia dependen del régimen de quimioterapia utilizado y del tipo de enfermedad tratada. En el caso de linfomas o neoplasias sólidas, la duración media de la neutropenia no suele superar los 7 días; por el contrario, el tratamiento de inducción en los pacientes con leucemia mieloide aguda lleva consigo periodos de neutropenia fácilmente superiores a 14-21 días. (Tabla II).

La propia neutropenia es causa de fiebre en este tipo de paciente, sin embargo, se calcula que el 50% de los pacientes neutropénicos febriles tienen una infección

establecida u oculta, y un 20% de los pacientes con <100 neutrófilos/ μl tendrán bacteriemia durante su evolución (18).

Tabla II.- Categorización por Riesgo de Neutropenia Febril

Alto Riesgo	Riesgo Moderado	Bajo Riesgo
Neutropenia > 14 días	7 – 14 días	< 7 días
Neoplasia hematológica Neoplasia activa TPH	Tumor sólido	Tumor sólido Remisión Quimioterapia convencional
Comorbilidad significativa Inestabilidad clínica	Mínima comorbilidad Estable	No comorbilidad Estable

La neutropenia es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de AI. La duración de la neutropenia y la intensidad de la misma son las variables directamente relacionadas con el desarrollo de AI (19-21). En los últimos años se han realizado distintas propuestas que intentan estratificar el riesgo *a priori* de AI.

En todas ellas la neutropenia profunda (< 200 polimorfonucleares/ μl) es considerada uno de los principales factores de riesgo. La duración para evaluar un episodio de neutropenia como de alto riesgo de AI es variable, según los diferentes expertos, oscilando entre 9 y 21 días de neutropenia. La intensidad de la neutropenia que se considera de riesgo también es variable; desde < 200 neutrófilos/ μl de cualquier duración a < 100 neutrófilos/ μl durante más de una semana (22-24).

Los pacientes con mayor riesgo de neutropenia profunda y prolongada son los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) o síndrome mielodisplásico (SMD) que reciben tratamiento de inducción o con enfermedad refractaria, así como los pacientes sometidos a TPH alogénico mieloablatoivo con fallo del injerto. La AI es

también una de las principales causas de mortalidad en pacientes con anemia aplásica y neutropenia prolongada (25).

Por último, en todos los estudios el antecedente de AI previa reciente se considera como un factor de alto riesgo para la reactivación de la misma en un periodo de neutropenia posterior. También la exposición a altas concentraciones ambientales de esporas de *Aspergillus* durante la neutropenia es considerada una situación de alto riesgo para el desarrollo de AI (26)

Importancia de las nuevas terapias biológicas

El mejor tratamiento de soporte y los avances en la profilaxis y tratamiento de las infecciones bacterianas, víricas y fúngicas por *Cándida* spp. del enfermo oncohematológico, han permitido ampliar el número de personas que pueden beneficiarse de un tratamiento más agresivo de su neoplasia hematológica de base. El aumento global de pacientes sometidos a estos tratamientos con quimioterapia es otro de los factores relacionados con la mayor incidencia de AI.

Dentro de los nuevos fármacos usados como tratamiento quimioterápico están los análogos de purina y el alemtuzumab. Los análogos de purina (fludarabina, cladribina y pentostatina) son fármacos cada vez más utilizados en el tratamiento de neoplasias hematológicas linfoides, entre las que destaca como indicación más frecuente el tratamiento de la leucemia linfática crónica (LLC). Además se usa como régimen de acondicionamiento en el TPH alogénico haploidéntico no mieloablativo y en el tratamiento de rescate, junto a altas dosis de citarabina, en la leucemia mieloide aguda (LMA) refractaria o recurrente.

El principal efecto de estos fármacos es la mielosupresión con la consiguiente neutropenia y una disminución marcada de los linfocitos T, particularmente de los linfocitos CD4, que se desarrolla en los primeros meses de tratamiento, aunque

persiste durante años tras la suspensión del medicamento. De forma menos marcada reducen la cifra de linfocitos B y de monocitos.

Su utilización se ha asociado a un aumento de las infecciones por patógenos oportunistas como *Poliomavirus*, *Listeria*, *Legionella*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* y *Toxoplasma* (27-29). Su utilización en pacientes con LLC (30, 31), como régimen de quimioterapia en el TPH no mieloablativo (32, 33) y como tratamiento de rescate de la LMA (34) se ha asociado a un aumento en la incidencia de aspergilosis.

Otro tratamiento cada vez más utilizado es el alemtuzumab. Se trata de un anticuerpo (AC) monoclonal humanizado dirigido contra el antígeno CD52. Está indicado en el tratamiento de la leucemia linfática crónica refractaria, leucemia prolinfocítica T, linfomas no Hodgkin refractarios y en el tratamiento de EICH.

El CD52 se encuentra en los linfocitos B y T sanos y en los leucémicos, en los monocitos y en los granulocitos. Este fármaco produce una linfopenia profunda (con CD4 <200/μl) y prolongada, que se puede mantener hasta un año tras la remisión completa de la enfermedad. Se acompaña de neutropenia grave en el 10% de los pacientes.

De todos los ACs. monoclonales que se utilizan en la actualidad es el que produce un mayor riesgo de complicaciones infecciosas. En el 28-42% de los enfermos se produce una infección oportunista (infecciones virales por herpes simple, varicela-zoster y citomegalovirus, listeriosis, tuberculosis, pneumocistosis, candidiasis, criptococosis, aspergilosis y mucormicosis).

Las complicaciones infecciosas son más probables en pacientes con tratamiento inmunosupresor previo y en los que el tratamiento no controla la enfermedad. Se ha comunicado una incidencia de infección por CMV del 3,6% y la de IFI puede

llegar al 6%. La utilización de profilaxis antifúngica frente a hongos filamentosos es opcional aunque muchos autores la recomiendan (35, 36).

El papel de los corticoesteroides

En los últimos años se ha visto el importante factor de riesgo para IFI que supone el uso de corticoesteroides en distintos grupos de pacientes. En algunos pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y/o asma, el uso de corticoesteroides por vía inhalada era el único factor de riesgo para el desarrollo de AI (37, 38), aunque la utilización de corticoesteroides sistémicos, el ingreso en unidades de cuidados intensivos y el empleo de antibioterapia de amplio espectro en pacientes con EPOC, también son factores de riesgo para el desarrollo de una AI (39).

Los corticoesteroides afectan a cada una de las células envueltas en la respuesta inflamatoria e inmune que se desencadena ante una IFI. Entre las alteraciones descritas pueden destacarse la producción de linfopenia y de monocitopenia, la disminución de la inmunidad celular tipo T reduciendo la proliferación y activación de los linfocitos T, la alteración de la función de los neutrófilos disminuyendo su capacidad de fagocitosis y su adherencia a la superficies celulares y, por último, la alteración de la función de monocitos y macrófagos, que es lo que más se ha relacionado con el aumento de incidencia de IFI por hongos filamentosos.

Los corticoesteroides disminuyen la producción de fagolisosomas y de óxido nítrico por los macrófagos, además de inhibir la maduración de los monocitos a macrófagos y su migración a los lugares de inflamación (40). Este efecto sobre los macrófagos, entre ellos los macrófagos alveolares que son una de las principales barreras innatas frente a las conidias de los hongos filamentosos, es uno de los principales factores implicados en la predisposición a las IFI que causan los corticoesteroides (9, 41).

Por otra parte, la toma de corticoesteroides es también uno de los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de candidiasis invasora tanto por *C. albicans* como *C. no albicans* en los pacientes con cáncer (42-44). El aumento del inóculo fúngico, la alteración de la función de los macrófagos y neutrófilos y la mayor capacidad de adherencia a la superficie epitelial de la *Cándida*, son los factores implicados en el aumento de la candidiasis invasiva en pacientes tratados con glucocorticoides.

Sin embargo, es la aspergilosis la IFI más frecuente asociada a uso de corticoesteroides. Además de los efectos descritos sobre la inmunidad que predisponen al desarrollo de la AI, los corticoesteroides alteran la biología de *Aspergillus* spp. El crecimiento de *A. fumigatus* y *A. flavus* in vitro aumenta cuando se añaden corticoesteroides (45).

Los hallazgos histopatológicos de los pacientes con AI cuyo principal factor predisponente es la toma de corticoesteroides, frente a los pacientes con AI en los que la neutropenia ha jugado el papel fundamental, son diferentes. En los primeros, el hallazgo histopatológico característico es la existencia de granulomas de monocitos y polimorfonucleares con áreas de necrosis inflamatoria, con escasa cantidad de hifas, invasión vascular y hemorragia. En las formas invasivas del paciente neutropénico, la necrosis coagulativa con extensas áreas de hemorragia y angioinvasión, así como la presencia de gran cantidad de hifas con poco componente inflamatorio son la regla (46, 47).

La asociación de AI y corticoesteroides ha sido ampliamente estudiada en los pacientes sometidos a TPH alogénico. Se ha visto que la utilización de grandes dosis de los mismos para la prevención y tratamiento de la EICH se asocia a un mayor riesgo de AI, así como en caso de presentarse ésta, a un peor pronóstico de la misma (19, 48-51).

Por último, los corticoesteroides son un factor de riesgo para el desarrollo de zigomicosis (52, 53) y de otras IFI por hongos emergentes (*Fusarium* spp., y hongos dematiáceos) (54-56).

Nuevas modalidades de trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)

El TPH, es una modalidad terapéutica de uso cada vez más extendido. Bajo este término no se incluye un único tipo de trasplante sino muchos. Atendiendo al tipo de donante, se habla de trasplante autólogo (TPH autólogo) cuando se utilizan progenitores del mismo paciente, alogénico (TPH alogénico) cuando el donante es una persona distinta al paciente y singénico cuando el donante es un gemelo univitelino.

En los trasplantes alogénicos hay que distinguir entre donante familiar y donante no emparentado según el parentesco existente o no entre donante y receptor. Según los estudios de antígenos de histocompatibilidad (HLA) se habla de trasplante de HLA genotípicamente idénticos, HLA fenotípicamente idénticos y HLA no idénticos.

También puede variar la fuente de progenitores, que puede ser la médula ósea, el cordón umbilical y la sangre periférica. Según el tipo de acondicionamiento se habla de trasplantes mieloablativos y no mieloablativos y, por último, debemos tener en cuenta si hay manipulación del inóculo, fundamentalmente si hay selección de células CD34 y de linfocitos T.

La utilización cada vez más frecuente de TPH alogénicos de donante no emparentado se ha relacionado con un mayor número de complicaciones infecciosas y entre ellas de IFI, ya que la menor similitud del HLA suele producir una mayor incidencia de EICH (57). La utilización del cordón umbilical como fuente de progenitores también se ha asociado a un aumento de la IFI (48, 58).

La utilización de regímenes de acondicionamiento no mieloablativos con menor toxicidad hematológica y gastrointestinal conllevan un aumento de la incidencia de AI con una alta mortalidad (80%) asociada a la misma. La aparición de EICH, el uso de esteroides, la neutropenia recidivante y la recidiva de la enfermedad de base, son los factores de riesgo relacionados con la aparición de IFI en estos pacientes (59).

La manipulación del inóculo, fundamentalmente la selección de células CD34 para disminuir la contaminación neoplásica del inóculo a trasplantar y la depleción de linfocitos T, se realiza para intentar reducir la incidencia de EICH, pero también se ha relacionado con un aumento en la incidencia de IFI (48, 60).

En los pacientes sometidos a TPH alogénico se distinguen claramente dos periodos de riesgo para el desarrollo de AI, el precoz y el tardío. En el periodo precoz (< 40 días) o periodo pre-injerto, los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de AI son la duración de la neutropenia, la manipulación del inóculo (depleción de linfocitos T y selección de CD34) y tener un SMD o anemia aplásica como enfermedad de base.

En el periodo tardío (40-180 días) o post-injerto, los factores de riesgo relacionados son además de la neutropenia y la manipulación del inóculo, la enfermedad por CMV, la linfopenia, la monocitopenia, la EICH, el uso de corticoesteroides y las infecciones por virus respiratorios (48). Hay pacientes que desarrollan la AI en un periodo muy tardío (> 180 días); el principal factor de riesgo en estos pacientes es la existencia de EICH muy extensa con uso de corticoesteroides y la enfermedad por CMV.

En diversos estudios se ha puesto de manifiesto la importancia cada vez mayor de la AI tardía, no sólo por su aumento en la prevalencia, sino por la dificultad para mantener pautas de profilaxis durante un tiempo tan prolongado y por estar asociadas a una alta mortalidad (19, 49, 61, 62). Son factores asociados a

mortalidad por AI tardía la presencia de EICH extensa y el tratamiento con alta dosis de esteroides en el momento del diagnóstico de la aspergilosis (63).

En un estudio reciente, entre 1248 pacientes sometidos a TPH alogénico, 163 fueron diagnosticados de AI probada o probable. Los factores de riesgo asociados al desarrollo de AI fue multifactorial con un predominio, en el periodo precoz (< 40 días tras TPH), de los factores relacionados con el huésped y el tipo de trasplante (edad avanzada, enfermedad de base, donante no emparentado, HLA-*mismatch* o recibir globulina antitimocítica como acondicionamiento) siendo los factores de riesgo en el periodo tardío (40-100 días tras TPH), aquellos relacionados con complicaciones posteriores del trasplante (enfermedad por CMV, transfusiones frecuentes, EICH severa y altas dosis de corticoides). Los principales factores de riesgo biológicos en ambos periodos fueron las múltiples citopenias y la sobrecarga férrica (64).

Aunque *A. fumigatus* es la especie que con más frecuencia causa enfermedad invasiva, se ha comunicado un aumento en la incidencia de AI por especies no-*fumigatus* en pacientes sometidos a TPH alogénico. En un estudio de cohortes retrospectivo realizado en Seattle, la incidencia de AI por *Aspergillus* no-*fumigatus* fue del 33,7% entre 1996-1998 frente al 18,3% entre 1993-1995 ($p=0.01$) (4). En este mismo estudio, se evidencia un aumento en la incidencia de infecciones por hongos filamentosos de géneros distintos al *Aspergillus* (no-*Aspergillus*), fundamentalmente infecciones por *Fusarium* spp. y Zigomicetos.

Los pacientes sometidos a varios trasplantes son los que más riesgo tienen de IFI por hongos filamentosos no-*Aspergillus*. Mientras que las infecciones por *Scedosporium* y *Fusarium* suelen aparecer en el periodo precoz postrasplante (< 30 días), presentando formas diseminadas en el momento del diagnóstico. Las infecciones por Zigomicetos suelen ser tardías (> 90 días) y estar más localizadas (pulmón y senos paranasales). Una de las características de estos hongos filamentosos no-*Aspergillus* es el alto porcentaje de resistencia intrínseca a la

anfotericina B y a otros antifúngicos, siendo multirresistentes en muchos casos. La utilización de voriconazol en profilaxis de pacientes sometidos a TPH y en pacientes con LMA se ha relacionado con el aumento en la incidencia de zigomicosis (65-72).

Prevalencia y mortalidad de la IFI en el paciente oncohematológico

Entre un 8-15% de los pacientes sometidos a TPH presentarán una AI (73). La AI es en la actualidad la principal causa infecciosa de fiebre persistente y la principal causa de muerte por infección en pacientes sometidos a TPH alogénico (8). De hecho, a pesar de los avances en el tratamiento, la mortalidad por AI se ha mantenido elevada, con cifras que se sitúan entre 30-70% en este tipo de pacientes (74).

En una revisión de los casos desde 1972 a 1995 la mortalidad asociada a aspergilosis cerebral, pulmonar y sinusal era del 99%, 86% y 66% respectivamente (75). La anfotericina B deoxicolato fue el tratamiento utilizado en la mayoría de los casos.

Posteriormente, Lin et al revisaron todos los casos publicados en la literatura desde 1995 a 1999. En esta revisión la mayoría de los pacientes eran tratados con anfotericina B deoxicolato, aunque en algunos casos se utilizaron las formas lipídicas de anfotericina o itraconazol. A pesar de ello, la mortalidad global era del 58%, siendo del 88% en pacientes sometidos a TPH alogénico y del 90% en aquellos con enfermedad diseminada o afectación del sistema nervioso central (SNC). (76)

La mortalidad por AI entre pacientes sometidos a TPH se ha situado históricamente en cifras de hasta el 80% (77). Datos más recientes, sin embargo, aportan cifras no tan elevadas de mortalidad, probablemente en relación al uso

extendido de voriconazol, el diagnóstico precoz de AI, el uso de regímenes de acondicionamiento no mieloablativos y el uso de células de sangre periférica (78, 79).

De hecho, en un estudio de pacientes oncohematológicos que comparaba tratamiento antifúngico con voriconazol vs anfotericina B deoxicolato la supervivencia a las 12 semanas fue del 70.8% en el grupo de voriconazol (144 pacientes) y del 57.9% en el de la anfotericina B deoxicolato (133 pacientes) (79).

En un estudio reciente de Neofytos et al. en el cual se aportan los datos de 16 centros de Norteamérica, la mortalidad por AI a las 6 y 12 semanas de seguimiento de 107 pacientes que habían recibido un TPH fue del 21,5% y 35,5% respectivamente(5).

En estudios de necropsia llevados a cabo en hospitales terciarios, es más frecuente encontrar en la actualidad hongos filamentosos que hongos levaduriformes, como la *Cándida* (80-82). Ello se debe en parte, a la utilización profiláctica de fluconazol en distintos grupos de riesgo, dado que éste carece de actividad frente a hongos filamentosos. Otra de las causas de este aumento en la prevalencia de AI en estudios de necropsia, es que a pesar de un tratamiento agresivo de la misma, esta sigue presentando altas tasas de mortalidad.

Un 10% de las muertes que ocurren en pacientes sometidos a TPH alogénico son debidas a aspergilosis, y hasta el 20% de los pacientes con leucemia aguda que fallecen presentan AI en la necropsia (8).

En un estudio retrospectivo realizado en una amplia cohorte de pacientes y publicado recientemente (83), se han investigado los factores de riesgo asociados a la mortalidad en este tipo de pacientes. Entre 289 episodios de AI, los factores predictores de mortalidad global fueron los siguientes: ser receptor de un trasplante hematopoyético alogénico o de órgano sólido, la progresión de la

enfermedad hematológica de base, presentar patología respiratoria previa, el tratamiento corticoideo crónico (0,2 mg/kg/día), la insuficiencia renal, presentar cifras bajas de leucocitos, tener una aspergilosis diseminada, la presencia de derrame pleural o consolidaciones difusas en la prueba de imagen y el diagnóstico de AI probada o probable frente a posible (según criterios EORTC-MSG) (84).

Al evaluar los factores predictores de mortalidad atribuible a la AI, aparecieron los mismos factores descritos con excepción de las cifras de monocitos y el derrame pleural, sin embargo, la neutropenia apareció como factor de riesgo de mortalidad atribuible a AI. En este mismo estudio, los rangos de supervivencia global y la relacionada con la enfermedad a las 12 semanas, fueron del 52,2% y 57,9% respectivamente (83).

Aspergillus fumigatus

El género *Aspergillus* se reconoció por primera vez en 1729 por Micheli, en Florencia. Fue nombrado así por la similitud existente entre la cabeza espurulante de una especie de *Aspergillus* y el hisopo usado para asperjar agua bendita (Ver imagen 1, 2 y 3). Virchow publicó las primeras descripciones microscópicas completas del microorganismo en 1856 (85).

El género *Aspergillus* está constituido por hongos filamentosos que habitualmente se reproducen asexualmente por conidias (*Deuteromycetes*), aunque algunas especies presentan reproducción sexual (*Ascomycetes*).

Aunque hay más de 200 especies de *Aspergillus*, menos de 20 son las causantes de enfermedad en el hombre. *A. fumigatus* es la especie que con más frecuencia causa enfermedad (90% de los casos), seguida de *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. nidulans*. El resto de las especies son causa de enfermedad de forma excepcional (86).

Los hongos filamentosos del género *Aspergillus* están ampliamente distribuidos en el ambiente, creciendo en el suelo, en las plantas y sobre todo en la materia orgánica en descomposición. Desde estos nichos se liberan conidias al aire en forma de aerosol, de tal manera que existen altas concentraciones de conidias en el aire exterior e interior de los hospitales y son frecuentes contaminantes de laboratorio.

Esta concentración de conidias se incrementa notablemente con los movimientos de tierras, la tala de árboles, las construcciones y los derribos, y se asocia a la aparición de brotes nosocomiales de aspergilosis (87). Es por ello que las principales puertas de entrada del *Aspergillus* son el tracto respiratorio (árbol traqueobronquial y senos paranasales), la piel gravemente dañada por traumatismos o heridas quirúrgicas, la córnea y el oído. Aunque el tracto gastrointestinal puede teóricamente ser una puerta de entrada, nunca se ha documentado clínicamente (86).

A. fumigatus es la especie más patógena. Produce unas esporas muy pequeñas (3-5 μm), por lo que penetran hasta los alvéolos pulmonares. Estas esporas están recubiertas de una capa hidrofóbica que les permite sobrevivir en condiciones atmosféricas extremas. Además *A. fumigatus*, tras invadir el árbol respiratorio, tiene una mayor capacidad de adherencia que otras especies a varias proteínas presentes en la superficie epitelial del huésped (fibrinógeno, laminina, fibronectina, complemento, inmunoglobulinas y surfactante pulmonar).

Tras la adhesión a la superficie epitelial, varios factores de virulencia se han descrito en las especies de *A. fumigatus* que le permiten la invasión. Destacan la producción de proteasas, catalasas, ribotoxina, fosfolipasas, hemolisinas, gliotoxina y aflatoxina. La gliotoxina reduce la fagocitosis de los macrófagos y neutrófilos, y su producción es claramente mayor en *A. fumigatus* que en otras especies de *Aspergillus* (88-91).

No está claramente establecido el periodo de incubación de la enfermedad, que es el tiempo entre la inhalación de las conidias y el desarrollo de enfermedad. Se han descrito casos con un periodo de incubación entre 3 días a 90 días y esta variabilidad depende, fundamentalmente, de la carga de inóculo y del grado de inmunosupresión del huésped.

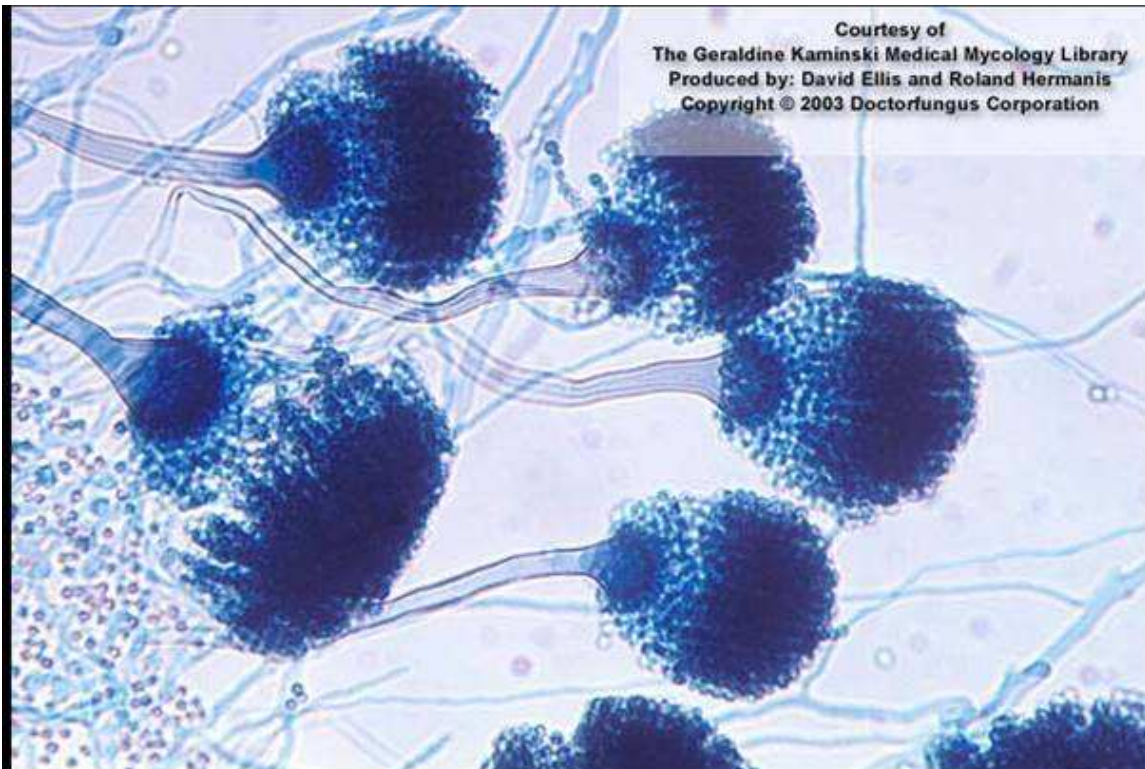


Imagen 1: Morfología microscópica de *Aspergillus fumigatus* que demuestra la morfología típica en columnas con las cabezas conidiales uniseriadas.
De: <http://www.doctorfungus.org/>

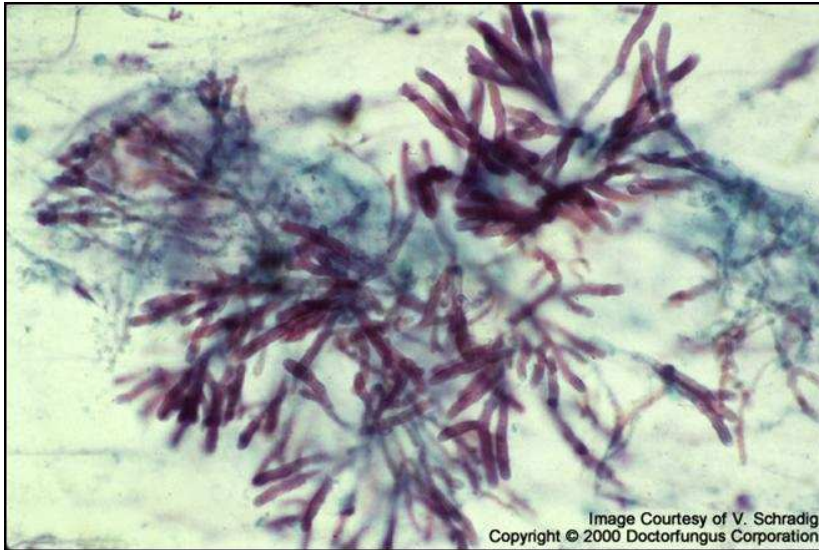


Image Courtesy of V. Schradig
Copyright © 2000 Doctorfungus Corporation

Courtesy of Deanna A. Sutton
Copyright © 2005 doctorfungus.org

Imagen 2 y 3: Morfología microscópica de *Aspergillus fumigatus*, se caracteriza por sus hifas tabicadas gruesas con ramificaciones en ángulo estrecho.
De: <http://www.doctorfungus.org/>



Diagnóstico de la aspergilosis invasiva (AI)

Introducción

La evaluación inicial de un paciente oncológico con fiebre o sospecha de infección debe estar guiada por el tipo de inmunodeficiencia subyacente y, por lo tanto, por la necesidad de tratamiento empírico (18).

En el paciente neutropénico siempre existe urgencia para iniciar el tratamiento empírico, ya que de la precocidad de este tratamiento va a depender el pronóstico. Debe indicarse, que la ausencia de capacidad inflamatoria de los pacientes con neutropenia puede enmascarar o ensombrear los síntomas y signos clínicos de infección, por lo que es necesario que se tenga en cuenta la posible existencia de infección en estos enfermos.

La fiebre es el principal y, frecuentemente, el único síntoma de infección. En el paciente neutropénico no se debe especular con la posibilidad de que sea un episodio febril autolimitado. Aunque puede ser que la fiebre tenga una causa no infecciosa, siempre se debe considerar como de origen infeccioso y manejarla como tal. El hecho de que la mayoría de los pacientes febriles sin otro signo de infección mejoren con tratamiento antibiótico de amplio espectro sugiere la presencia de una infección oculta. La fiebre puede estar incluso ausente por efecto de los fármacos utilizados, aunque esto es poco frecuente.

El diagnóstico clínico tiene una baja rentabilidad ya que existe una capacidad reducida para desarrollar signos inflamatorios que ayuden a establecer el diagnóstico de un posible foco infeccioso. Así mismo, el diagnóstico microbiológico sólo se alcanza en un tercio de los episodios febriles en pacientes neutropénicos.

Rentabilidad de los cultivos microbiológicos convencionales en el diagnóstico de AI en pacientes hematológicos

La rentabilidad y la especificidad de los cultivos de muestras biológicas habituales (sangre, esputo, exudado nasal, etc.) es baja en el diagnóstico de AI, por lo que la certeza del mismo requiere la realización de biopsias que pueden estar contraindicadas en un alto porcentaje de estos pacientes por causas diversas (trombopenia severa, insuficiencia respiratoria aguda, alteraciones de la coagulación, etc.) (92). Estas dificultades diagnósticas hacen que se subestime la frecuencia de la AI, como se hace evidente en estudios de necropsia, que han demostrado que hasta en un 68% de los pacientes oncohematológicos tenían AI en el momento de su muerte, y ésta no se sospechó (93, 94).

El esputo es una de las muestras mas significativas que se procesan en el laboratorio de microbiología, tanto para el examen directo como para el cultivo de hongos. Su sensibilidad es baja (<20%) y tardía para el diagnóstico de AI. Además, su especificidad diagnóstica es variable, pues es difícil discriminar entre contaminación, colonización o invasión, ya que *Aspergillus* es un contaminante frecuente. Varios estudios han intentado determinar el valor predictivo positivo del hallazgo en el esputo de *Aspergillus* spp. en distintas poblaciones de riesgo (95-97). En pacientes con leucemia aguda o neutropénicos, el valor predictivo del cultivo de esputo para el diagnóstico de AI oscila entre 46-72%, aunque en pacientes sometidos a TPH puede ser de hasta un 82%.

La sensibilidad del cultivo del lavado broncoalveolar (LBA) en pacientes con AI es mayor, aunque no supera el 60% y como en el esputo, su hallazgo es tardío (98-101). En pacientes con lesiones pulmonares únicas y periféricas, la sensibilidad del LBA es aún menor. Para este tipo de lesiones, algunos autores han utilizado la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) bajo control radiológico, que presenta una baja tasa de complicaciones y alto rendimiento diagnóstico (102).

La detección de *Aspergillus* spp. en el hemocultivo es excepcional y tardía en pacientes onco-hematológicos. En la mayoría de los casos su detección es posterior o inmediatamente anterior al *exitus*. Lo principal es distinguir si se trata de una aspergilemia verdadera o de una contaminación. El aislamiento de *A. terreus* hace más probable que la aspergilemia sea significativa(103).

En los últimos años, en un intento de minimizar estas dificultades, se ha avanzado en los métodos de diagnóstico alternativos al cultivo en la AI. Estos métodos se basan en la utilización precoz y secuencial de la tomografía axial computerizada de alta resolución (TACAR) y en la detección de antígenos fúngicos (98).

Técnicas de diagnóstico alternativas al cultivo para la detección de la AI

Dadas las dificultades y la baja rentabilidad de las técnicas diagnósticas tradicionales, se han desarrollado técnicas no invasivas alternativas al cultivo como el TACAR y técnicas de detección de antígenos fúngicos, como el galactomanano (GM) usado en la práctica clínica diaria y el 1-3 β -D Glucano (BG), con el que se dispone de menor experiencia, pero que ha sido incluido entre los criterios EORTC-MSG (84) para el diagnóstico de IFI.

Aportación del TACAR en el diagnóstico precoz de la AI

El TACAR de tórax es más sensible y precoz que la radiología convencional (Rx) de tórax en el diagnóstico de neumonía en pacientes con neutropenia febril sin respuesta a tratamiento antibiótico.

En un estudio prospectivo llevado a cabo en estos pacientes, un 60% de los mismos con Rx de tórax normal, presentaron infiltrados radiológicos en el TACAR, permitiendo adelantar el diagnóstico clínico en 5 días respecto a la radiología convencional. A los pacientes que tuvieron alteraciones radiológicas en el TACAR,

se les realizaron distintas técnicas diagnósticas (cultivo de esputo, LBA, PAAF y biopsia pulmonar) y en un 54% se consiguió un diagnóstico microbiológico.

Se calculó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del TACAR en el diagnóstico de neumonía. La S fue del 87%, la E del 57%, el VPP del 54% y el VPN del 88%. En el subgrupo de paciente sometidos a TPH, el VPN fue del 97% (104).

La realización rutinaria del TACAR en pacientes con sospecha de AI ha permitido la descripción de dos signos sugestivos de la misma, el signo del halo y el de la media luna. El signo del halo es un signo precoz y permite adelantar el diagnóstico de AI (105-107). Un estudio retrospectivo llevado a cabo por Caillot et al (108) demostró que el 92% de los pacientes con AI probada o probable presentaban lesiones con signo del halo antes del diagnóstico de AI, permitiendo adelantar el diagnóstico de la misma en 5,1 días.

En un estudio posterior, este mismo autor documentó que el signo del halo es transitorio. En 25 pacientes con AI probada, se realizaron TACAR secuenciales en el plazo de 14 días (días 0, 3, 7 y 14). En el día 0, el signo del halo estaba presente en el 95% de los pacientes, en el día 3 en el 68%, el día 7 en el 22% y el día 14 en el 19% de los casos, por lo que se puso de manifiesto la importancia de realizar precozmente el TACAR en pacientes con sospecha de AI (109).

El TACAR, además de adelantar el diagnóstico, permite una mejor localización de las lesiones. Lo que parece de vital importancia en el 10-15% de los pacientes con diagnóstico de AI, que fallecen de hemoptisis al tener lesiones que contactan con las arterias pulmonares (110).

Las indicaciones de cirugía de la AI, además de la prevención de la hemoptisis masiva y de la reducción de la masa fúngica antes de un nuevo ciclo de quimioterapia, es la de obtener una confirmación diagnóstica (111, 112). La

precocidad en el diagnóstico y la mejor caracterización de las lesiones, para realizar una lobectomía urgente en casos de lesiones con riesgo de hemoptisis masiva, permite la reducción de la mortalidad por AI del 50% al 17% (108).

Detección de antígenos fúngicos en el diagnóstico de AI. Galactomanano y 1-3 β -D Glucano

Galactomanano

El galactomanano (GM) es un componente de la pared celular del *Aspergillus* spp. que se libera durante la fase de crecimiento del hongo. Fue el primer antígeno detectado en animales con aspergilosis experimental y en pacientes diagnosticados de aspergilosis (87).

Se trata de un antígeno polisacárido constituido por una estructura lineal de residuos de manosa y cadenas laterales de galactofuranosina y su detección se debe a la capacidad inmunogénica que le confiere la estructura citada (113).

Una técnica de ELISA tipo *sándwich* (Platelia *Aspergillus*, BioRad® Maners-La-Coquette, France) es la técnica de detección comercializada más sensible, con un límite de 0,5 -1 ng/ml. Esta técnica utiliza el anticuerpo monoclonal EB-A2, que reconoce las cadenas laterales de galactofuranosina de la molécula de galactomanano (114).

Este test fue comercializado en Europa a mediados de 1990 y posteriormente aprobado para su uso diagnóstico por la US Food and Drug Administration en el 2003. Sin embargo han existido discrepancias a la hora de establecer el punto de corte de esta técnica. En Europa, originariamente se recomendaba un punto de corte de 1,5 ng/ml para un resultado positivo. Posteriormente y con la práctica clínica, se ha rebajado este punto de corte a 1 ng/ml y, actualmente, se recomienda un punto de corte de 0,5 ng/ml. La US Food and Drug Administration

también recomienda un punto de corte de 0,5 para considerar un resultado positivo.

El GM ha sido aceptado y validado como marcador subrogado de AI en el paciente neutropénico (115). Más recientemente y apoyándose en todos los datos aportados en la literatura, se ha postulado que el galactomanano podría también ser usado como marcador de seguimiento y evolución en el paciente onco-hematológico (116).

Woods et al publicaron un estudio en el que se observaba una excelente correlación entre los niveles séricos de galactomanano y la evolución de la AI en pacientes diagnosticados de mieloma múltiple (117).

Otra importante contribución de la determinación de GM es su valor como marcador pronóstico de AI. En animales con AI experimental, el nivel de antigenemia se relaciona con la masa fúngica y el tratamiento reduce los niveles de antigenemia. Esto mismo ha sido comunicado en pacientes sometidos a TPH, donde la elevación de los niveles de antigenemia se asocia a un peor pronóstico (118, 119).

Recientemente, Maertenes et al han presentado un estudio de 70 pacientes oncohematológicos diagnosticados de AI probada o probable y con neutropenia en el momento del diagnóstico. En dicho estudio se observó que la supervivencia fue mayor en aquellos pacientes con normalización de los niveles de GM, frente a la de los pacientes que mantenían niveles elevados (120). El GM presentó además una excelente correlación estadística con la AI probada diagnosticada mediante autopsia (120, 121).

En un meta-análisis publicado por Pfeiffer et. al. en el que se incluían 27 estudios, la sensibilidad global del GM fue del 71% y la especificidad del 89% para el diagnóstico de AI probada. La media del *Youden Index* fue del 0,54 lo que

indicaba una fiabilidad adecuada para el punto de corte elegido para interpretar el test del GM (122). (Tabla III).

En otra revisión realizada por Leeflang et. al. publicada en la Cochrane Database Syst Rev. se incluyeron únicamente estudios en pacientes neutropénicos. En siete estudios en los cuales el punto de corte para el GM fue del 0,5, la sensibilidad global fue del 78% y la especificidad del 81%. Por otra parte, para un punto de corte de 1 (12 estudios) y de 1,5 (17 estudios), la sensibilidad global respectivamente fue del 75% y del 64%, y la especificidad del 91% y 95% (123).

La detección de galactomanano mediante la técnica de ELISA en sangre ha sido validada prospectivamente tras los metanálisis antes mencionados. Estos trabajos han sido llevados a cabo en pacientes neutropénicos y en pacientes sometidos a TPH. La S según los diversos estudios está entre un 47% y un 100% y la E suele ser superior al 80%, con un valor predictivo positivo variable (46-75%) y un valor predictivo negativo superior al 70% (Tabla IV). Tarinover et. al. han aportado porcentajes de rentabilidad diagnóstica más bajos.(124)

Existen diferencias en la S y E que no se explican sólo por las discrepancias en las poblaciones de estudio y/o en el límite de detección del GM (125, 126). Se ha visto que la S es menor en pacientes donde la neutropenia no es el principal factor de riesgo, como son los pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido (TOS) (127) lo que se puede explicar por una menor carga fúngica y por la presencia de anticuerpos frente a *Aspergillus*. También se ha visto una menor E en pacientes sometidos a TPH, por un mayor número de falsos positivos (128).

En el metanálisis efectuado por Pfeiffer y colab. en el que se incluían tres estudios en pacientes sometidos a TOS con AI probada o probable, la sensibilidad global del GM de estos trabajos fue del 41% y la especificidad de 85% (122).

Tabla III Principales estudios de GM incluidos en el meta-análisis de diagnóstico de AI en el paciente oncohematológico (de 1995 al 2005).

Adaptada de Pfeiffer et al (122)

Estudio	Pacientes Diseño Estudio	GP¹	IFI²	VP³	FN⁴	FP⁵	VN⁶	S⁷	E⁸
Becker et al (2000)(129)	O-Hemato ⁹ Adultos Prospectivo	≥1 2GM	2Pr ¹⁰ 11Pb ¹¹	6	7	12	62	46%	84%
Platelia package insert(2003) (130)	O-Hemato NR ¹² Prospectivo	≥0,5 2GM	NR	25	6	16	132	81%	89%
Bretagne et al(1997)(131)	O-Hemato Todos Prospectivo	≥1 2GM	3Pr 3Pb ¹³	6	10	0	34	100%	77%
Bretagne et al(1998)(132)	TPH Todos Retrospectivo	≥1 2GM	6Pr 12Pb	14	4	5	18	78%	78%
Buchheidt et al(2004)(133)	O-Hemato Adultos Prospectivo	≥1,5 2GM	6Pr 3Pb	3	6	1	167	33%	99%
Costa et al (2002)(134)	O-Hemato Adultos Retrospectivo	≥1,5 1GM	4Pr 16Pb	20	0	0	10	100%	100%
Herbrecht et al(2002)(128)	O-Hemato Todos Prospectivo	≥1,5 1GM	31Pr 67Pb	31	67	51	648	32%	93%

Jarque et al (2003)(135)	O-Hemato Adultos Prospectivo	≥1,5 2GM	9Pr 3Pb	8	4	3	85	67%	97%
Kami et al (2001)(136)	O-Hemato Adultos Prospectivo	≥1,5 2GM	33Pr 0Pb	19	14	3	86	58%	97%
Machetti et al (1998)(137)	TPH NR Prospectivo	≥1,5 2GM	1Pr 3Pb	3	1	3	15	75%	83%
Maertens et al (1999)(121)	O-Hemato Todos Prospectivo	≥1 2GM	27Pr 0Pb	25	2	2	42	93%	95%
Maertens et al (2002)(138)	TPH Adultos Prospectivo	≥1 2GM	5Pr 8Pb	11	2	7	82	85%	92%
Maertens et al (2004)(139)	O-Hemato Adultos Prospectivo	≥0,5 2GM	16Pr 13Pb	28	1	2	93	97	98%
Marr et al (2004)(140)	O-Hemato Todos Prospectivo	≥1 1GM	13Pr 11Pb	13	11	11	32	54%	74%
Moragues et al (2003)(141)	O-Hemato Adultos Retrospectivo	≥1,5 2GM	3Pr 1Pb	2	2	1	49	50%	98%
Pazos et al (2003)(142)	O-Hemato NR Prospectivo	≥1,5 2GM	5Pr 3Pb	7	1	3	143	88%	98%
Pinel et al (2003)(143)	O-Hemato Todos Prospectivo	≥1 2GM	3Pr 31Pb	17	17	17	756	50%	98%

Rovira et al (2004)(144)	TPH Adultos Prospectivo	≥1,5 1GM	1Pr 5Pb	4	2	2	66	67%	97%
Suhalian et al(2001)(145)	TPH Adultos Prospectivo	≥1,5 1GM	22Pr 22Pb	17	5	32	396	77%	93%Pr
Suhalian et al(1996)(146)	TPH NR Prospectivo	≥1 1GM	25Pr NR	19	6	53	138	76%	72%Pr
Ulusakarya et al (2000)(147)	O-Hemato Todos Retrospectivo	≥1 1GM	10Pr 6Pb	11	5	6	113	69%	95%
Verweij et al (1995)(148)	O-Hemato Adultos Retrospectivo	≥1 2GM	6Pr 0Pb	5	1	18	36	83%	65%
Yoo et al (2005)(149)	O- Hemat/TPH Adultos Prospectivo	≥0,5 2GM	2Pr 12Pb	12	2	25	89	86%	78%

¹GP: Galactomanano positivo punto de corte y número de muestras para considerar resultado como positivo; ²IFI: infección fúngica invasiva; ³VP: Verdadero positivo; ⁴FN: Falso negativo; ⁵FP: Falso positivo; ⁶ VN: Verdadero negativo. ⁷S: Sensibilidad; ⁸E: Especificidad; ⁹O-Hemato: Onco-hematológico; ¹⁰AIPr: Aspergilosis invasiva probada; ¹¹AI Pb: Aspergilosis invasiva probable; ¹²NR: No se refiere.

Tabla IV. Principales estudios de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la determinación de GM por ELISA Platelia en sangre en pacientes oncohematológicos desde el 2006 a la actualidad.

Estudio	Episodios de riesgo	GP ¹	IFI	S ²	E ⁴	VVP ⁴	VVN ⁵
Florent et al (2006)(150)	167 pacientes O-hematológicos ⁶ Neutropénicos Prospectivo	≥0,5 2GM	4 AIPr ⁷ 29 AIPb ⁸ 18 AIPs ⁹	47,1%	80,2%	51,1%	77,5%
Busca et al (2006)(151)	74 pacientes TPH Alogénico Prospectivo	≥ 1 2GM	2 AIPr 7 AIPb	100%	93%	64%	100%
Lai et al (2007)(152)	189 pacientes O-hematológico Inmunosuprimido Prospectivo	≥1,5 2GM	5 AIPr 9 AIPb 26 AIPs	78,6%	93,9%	55%	97,9%
Foi et al (2007)(153)	121 pacientes TPH Retrospectivo Recogida prospectiva (71adultos/50niños)	≥0,5 2GM	2 AIPr 10 AIPb	50%	94%	46%	94%
Tariver et.al (2008)(124)	58 pacientes O-hematológicos Neutropénicos Prospectivo	≥0,5 2GM	1 AIPr 4 AIPb 20 AIPs	84%	27,3%	46,7%	69,2%
Suarez et al (2008) (154)	138 pacientes O-hematológicos Prospectivo	≥0,5 2GM	1 AIPr 15 AIPb 1 AIPs	88.2%	95,8%	75%	98,3%

¹GP: Galactomanano positivo punto de corte y número de muestras para considerar resultado como positivo; ²S: Sensibilidad; ³E: Especificidad; ⁴VPP: Valor predictivo positivo; ⁵VPN: Valor predictivo negativo; ⁶O-Hematológico: Oncohematológico; ⁷AIPr: Aspergilosis invasora probada; ⁸AIPb: Aspergilosis invasora probable; ⁹AIPs: Aspergilosis invasora posible.

Marr K et. al. mostraron que en pacientes sometidos a TPH con AI probada, la sensibilidad del GM variaba desde un 87,5%, en pacientes sin tratamiento antifúngico, a un 20% en aquellos que recibían tratamiento. Por tanto, el uso de antifúngicos con actividad frente a *Aspergillus* disminuye la S del test y aumenta el porcentaje de falsos negativos, por lo se aconseja que en pacientes tratados con antifúngicos con actividad frente a *Aspergillus* se escoja el nivel de corte inferior (0,5 ng/ml) para considerar un valor como positivo (140).

Por otra parte, la estrategia de extracción de muestras en pacientes neutropénicos no está claramente definida, y aunque la mayoría de los estudios la realizan dos veces por semana, una menor frecuencia o falta de adherencia a estos protocolos puede alterar la sensibilidad de la prueba.

En el estudio de Foy et. al. se observó una mayor S y E del test de GM en pacientes en edad pediátrica en comparación con adultos, sin embargo, en estudios europeos previos, se sugería que los resultados de GM presentaban mayor frecuencia de falsos positivos y una menor especificidad en pacientes pediátricos (153)

Así, aunque en la mayoría de los estudios la E supera el 90%, en trabajos realizados con neonatos se ha visto una especificidad inferior por la ingestión de sustancias que contienen galactomanano (leche o cereales), que por traslocación (mucositis intensa) alcanzan el torrente sanguíneo (128, 145, 155-158).

Otra causa de falsos positivos es la administración de antibióticos de la familia de los betalactámicos, principalmente piperacilina-tazobactam (159-161), lo que se explica por la presencia de galactomanano en algunos lotes del fármaco.

Aunque algunos autores han descrito que las elevaciones de galactomanano suelen ser transitorias y relacionadas con la administración del fármaco, un estudio farmacocinético ha demostrado que el GM puede permanecer elevado

hasta 5 días después de la interrupción de la medicación (162) . En revisiones más recientes, otros fármacos betalactámicos como la amoxicilina, la amoxicilina-clavulánico y la ampicilina también pueden producir falsos positivos (163, 164).

También se han visto falsos positivos con la administración de preparados de nutrición parenteral (165). Recientemente Asano-Mori et. al. han observado falsos positivos de GM en los primeros 100 días tras el trasplante alogénico de médula ósea y en la EICH crónica gastrointestinal(166)

Por último, la presencia del GM en la pared no es exclusiva del *Aspergillus*, y la infección por otros hongos también puede producir reactividad cruzada, como es el caso de *Penicilium* spp., *Paecilomyces* spp., *Histoplasma* spp., *Cryptococcus* spp. y *Blastomyces* spp., y quizá también en el caso de *Fusarium* spp. (167-171).

Un tema debatido y de gran trascendencia clínica es si la detección prospectiva de GM en pacientes con riesgo de AI, contribuye al diagnóstico precoz de la enfermedad. En varios estudios prospectivos realizados por Maertens y cols (121, 138, 172) se resaltó el valor del GM como test válido para el diagnóstico precoz de la AI. En ellos, la positividad de GM se adelantó una media de 5 días al inicio de fiebre, y en el 50% de los casos fue el primer marcador de enfermedad.

Sin embargo, esto no ha sido confirmado por otros autores. En un estudio realizado por Herbrecht et al, sólo en 3/153 casos de AI, la positividad del GM fue el primer indicador diagnóstico (128). En otro estudio en pacientes sometidos a TPH, este test no permitió adelantar el diagnóstico en ningún caso (144). Otros autores han concluido que la determinación de GM no antecede al desarrollo de síntomas clínicos o a las alteraciones radiológicas en los pacientes con AI (144, 173).

La detección de GM en muestras no séricas (orina, LBA, líquido cefalorraquídeo (LCR)), se ha utilizado en el diagnóstico clínico de la AI, aunque no ha sido

validada en la práctica clínica por falta de estudios prospectivos que incluyan un número suficiente de pacientes con AI probada (174). La eliminación de GM en la orina fue el origen de su utilización como técnica para el diagnóstico de AI, aunque se ha documentado un mayor porcentaje de falsos positivos que en las muestras séricas (175).

La validación del LBA como muestra para detección de GM en casos de AI junto con el TACAR ha sido realizada en un estudio prospectivo en pacientes hematológicos con VPP y VPN del 100%. Es claramente más sensible para el diagnóstico de AI que los métodos convencionales de cultivo, lo que permite evitar la práctica de biopsias que en muchas ocasiones están contraindicadas en estos pacientes (176, 177). Sin embargo está por establecer el punto de corte que distinga la enfermedad invasora de una colonización.

La aspergilosis cerebral es una entidad de difícil diagnóstico clínico, y rara vez el cultivo del LCR es positivo. La detección de GM podría ayudar a un diagnóstico de esta entidad, aunque no existen evidencias suficientes hasta la fecha (178, 179).

1-3 β -D Glucano

El 1-3 β -D glucano (BG) es un polisacárido presente en la pared celular de una gran variedad de hongos excepto en los zigomicetos (*Mucor* spp. y *Rhizopus* spp.) y *Cryptococcus* spp. (180, 181). Aunque esto último se ha puesto en duda en algunos estudios (182, 183). Parece que existe BG en la pared celular de *Cryptococcus* spp. aunque en menor cuantía a la encontrada en *Candida* spp. o *Aspergillus* spp. (184).

El BG se puede detectar gracias a su capacidad para activar la cascada de la coagulación del cangrejo, ya que se une específicamente a la subunidad α del factor G. Si a esta reacción se le añade un sustrato cromogénico se pueden

detectar mediante espectrofotometría niveles de BG tan bajos como de 1 pg/ml (182).

Se han comercializado varios métodos de detección que utilizan distintos sustratos. Pero los más conocidos son el método comercial Fungitec-G (Seikagaku) que utiliza las enzimas del *Tachipleus tridentatus* y el método comercial GlucateLL o Fungitell (Associates of Cape Cod, Inc.) que utiliza como sustrato las enzimas del *Limulus polyphemus*.

En un estudio de cinética llevado a cabo por Obayashi et al se demostró que el GlucateLL es 2,5 veces menos reactivo que el Fungitec-G. Con Fungitec-G el autor sugirió en 1995, un punto de corte de 20 pg/ml comparando los niveles de BG en sujetos sanos y sujetos con IFI confirmada por necropsia (185). Sin embargo en un estudio reciente, este mismo autor refiere que con un punto de corte de 30 pg/ml se mantiene una alta sensibilidad de la técnica, siendo posible descartar IFI por debajo de dicho valor, exceptuando el caso de la Zigomicosis, mientras que para un punto de corte por encima de 80 pg/ml debería considerarse la IFI con un 90% de probabilidad (183).

El punto de corte sugerido para la técnica GlucateLL es de 60 pg/ml en sujetos con candidemia confirmada. El punto de corte para el diagnóstico del resto de las IFI no está establecido con este test (182). La S, E, VPP y VPN de la determinación del BG por el método de detección GlucateLL en el diagnóstico de la IFI, depende de la etiología de la misma (candidiasis, aspergilosis, fusariosis etc.) y del punto de corte elegido (40 pg/ml-150 pg/ml). Otros dos factores relacionados con la S, E, VPP y VPN, son la certeza diagnóstica de la IFI y el protocolo de extracción de las muestras clínicas (182, 186). (TablaV)

Tabla V. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la determinación de 1-3 B-D glucano en el diagnóstico de infección fúngica invasiva.

Punto de corte (IFI global)⁵	S¹	E²	VPP³	VPN⁴
40 pg/ml	79.1	79.4	78.7	79.9
60 pg/ml	69.9	87.1	83.8	75.1
100 pg/ml	62.6	94.7	91.9	72.5
125 pg/ml	60.1	96.5	94.2	71.6
Etiología de la IFI				
Candidiasis global (60 pg/ml) ⁵	82.6			
C. albicans (60 pg/ml)	83.3			
C. parapsilosis(60 pg/ml)	72.2			
C. tropicalis (60 pg/ml)	90.9			
C. glabrata (60 pg/ml)	80.8			
C. krusei(60 pg/ml)	100			
Aspergilosis (60 pg/ml) ⁵	80			
Aspergilosis (120 pg/ml) ⁶	87.5	89.6	70	96.3
Fusariosis (60 pg/ml) ⁵	100			
Criptococosis ⁵	25			
Mucormicosis ⁵	0			
Certeza diagnóstica⁷				
Probada o probable	100	90	43	100
Probada, probable o posible	70	96	79	93
Número muestras⁷	Probada/probable	LAM⁸/SMD⁹		
1 muestra positiva	100	90	43	100
≥2 muestras consecutivas positivas	65	96	57	97
≥3 muestras consecutivas positivas	60	99	80	96

¹S: Sensibilidad; ²E: Especificidad; ³ VPP: Valor predictivo positivo; ⁴ VPN: Valor predictivo negativo; ⁵IFI Infección fúngica invasiva. Tomado de Ostrosky-Zeichner et al (186) Estudio multicéntrico con pacientes con IFI probada y probable y sin IFI; ⁶Tomado de Pazos C et al (181) Estudio prospectivo en pacientes onco-hematológicos; ⁷Tomado de Odabasi Z et al (182); ⁸ Leucemia Aguda Mieloide; ⁹ Síndrome Mielodisplásico.

En el estudio de Odabasi et. al. (182), al valorar la S y E en un estudio de 30 pacientes sanos y 30 pacientes con candidemia no neutropénicos con el punto de corte de 60 pg/ml, se obtienen valores de 97% y 93% respectivamente. Similares datos aporta el estudio de Pickering et. al. (187), en el cual para un punto de corte de 80 pg/ml con la técnica de Fungitell, la S y E fue del 92,9% y 100%. En este mismo estudio al incluir pacientes con bacteriemia la E y el VPP disminuyen a un 77,2% y un 51,9% respectivamente, por el incremento de falsos positivos.

Estudios comparativos betaglucano y galactomanano.

En el diagnóstico de la AI, un estudio reciente señala que la S, E, VPP y VPN del BG (técnica de glucatell para un punto de corte ≥ 120 pg/ml) es similar a la obtenida con la determinación prospectiva de galactomanano (87.5%, 89.6%, 70% y 96.3%, respectivamente) en pacientes onco-hematológicos con AI probada y probable. Una ventaja adicional es que el BG es más precoz que la determinación de GM para el diagnóstico de AI. Además, la determinación conjunta puede ayudar a delimitar los falsos positivos de cada uno de los test (181).

Kami et. al. encontraron la técnica de GM menos sensible que el BG (Fungitec) (58% vs 67%) para el diagnóstico de AI pulmonar (136). En un trabajo recientemente publicado por Hachem et. al. (6) en el que se incluyeron 82 pacientes con infección fúngica por *A. fumigatus*, pacientes con infección por *Aspergillus* no *fumigatus* y pacientes con infección por otro tipo de hongos, además del grupo control, se observó una sensibilidad mayor para BG en relación al GM para la detección de AI y de otras infecciones fúngicas. La sensibilidad del GM fue significativamente mayor para pacientes con AI por especies distintas *A.fumigatus*. Sin embargo el rango de S y E para la técnica de BG fue similar en todos los grupos independientemente del patógeno identificado.

Tabla VI. Estudio en 82 pacientes con IFI

Modificado de Hachem et. al. (6)

IFI	Técnica	S ¹	E ²	VPP ³	VPN ⁴
Aspergilosis (n=22)	GM	38	100	100	61
	BG	67	90	88	72
Candididemia (N=23)	GM	0	100	----	49
	BG	62	90	87	69
Otros hongos (N=17)	GM	6	100	100	57
	BG	63	90	83	75

¹S: Sensibilidad; ²E: Especificidad; ³VPP: Valor predictivo positivo; ⁴VPN: Valor predictivo negativo

La hemodiálisis con membranas de celulosa en pacientes con insuficiencia renal crónica, el tratamiento con inmunoglobulinas y la exposición a sustancias que contengan glucanos son causas de falsos positivos en la determinación de BG. La presencia de bacteriemia es también causa de falsos positivos en la determinación de BG, fundamentalmente la bacteriemia por cocos gram positivos (187). El tratamiento con antifúngicos parece reducir la sensibilidad y aumentar el porcentaje de falsos negativos, aunque menos que con la determinación de GM (181, 186).

Técnicas moleculares para el diagnóstico de la AI. Determinación de ADN fúngico mediante la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR).

Debe señalarse no obstante, que en términos generales, las aportaciones de todas las técnicas anteriores pueden considerarse discretas, por lo que se están intentando desarrollar otros procedimientos diagnósticos que permitan detectar la infección por *Aspergillus* con más fiabilidad y precocidad. Entre estos métodos se

encuentran técnicas moleculares para la detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) fúngico.

Las técnicas para la detección de ADN se han desarrollado menos que los métodos de detección antigénica. Además, se han evaluado técnicas no estandarizadas para detectar ácidos nucleicos de levaduras y hongos miceliales. Habitualmente, se han amplificado las regiones ITS (*Internal Transcriber Spacer*), insertadas en los fragmentos de DNA ribosómico, llegándose a detectar cantidades muy pequeñas de ADN (10 pg).

Sin embargo, la limitación de estas técnicas no es la sensibilidad sino la especificidad, que se sitúa alrededor del 70% (188, 189). Por ello, las técnicas moleculares cuantitativas pueden ser de mayor utilidad para el diagnóstico de las micosis. Una de estas técnicas es la PCR en tiempo real (PCR-TR), que ha mostrado eficacia para el diagnóstico y la detección de resistencias en bacterias y virus, por lo que se está evaluando, con resultados dispares, para el diagnóstico de las infecciones fúngicas (134, 136, 190).

Algunos autores confirman, que las técnicas moleculares pueden tener una sensibilidad algo superior a las técnicas de cultivo y a la detección antigénica y lo que es más importante, ser más útiles para el diagnóstico precoz de la IFI. Sus principales limitaciones incluyen la falta de reproducibilidad y cierta variabilidad según la muestra utilizada, ya que han resultado valiosas en muestras respiratorias, pero no tanto en muestras de sangre y de suero (191, 192).

Otra de las ventajas de las técnicas moleculares es que pueden diseñarse modelos que sirvan para el diagnóstico de infecciones por otras especies. Como ya se ha indicado, cada vez se identifican más especies fúngicas patógenas para el ser humano y las técnicas moleculares pueden detectar distintas especies según sean diseñadas (193).

En el caso de la aspergilosis, la falta de estandarización de las distintas técnicas de PCR para la detección de *Aspergillus* spp. es la principal barrera para la aplicación de esta técnica en la práctica clínica diaria. En los distintos estudios se emplean diferentes muestras biológicas, métodos de extracción y/o métodos de amplificación y detección.

La muestra biológica utilizada en los estudios para el diagnóstico de AI es variable. Se han utilizado distintas fracciones de sangre, LBA y muestras de tejido en fresco y en parafina. La detección en sangre tiene el inconveniente de que aún no está claro cuál es la fracción de sangre a utilizar. Parece que la detección de ADN en sangre completa es superior a la detección en plasma en el diagnóstico de AI, sin embargo, el suero tiene la ventaja de que de forma concomitante se puede proceder a la detección de antígenos de *Aspergillus* spp. y no requiere la adición de anticoagulantes que pueden inhibir la amplificación por PCR (126, 134, 194, 195). En el trabajo de Costa y cols. se compararon ambas muestras y se observó que la detección de DNA de *A. fumigatus* en suero fue mejor que en plasma.(196)

La extracción del ADN es un paso clave fundamental y difícil debido a las características de la pared fúngica. Se han descrito distintos métodos de extracción (métodos caseros, métodos comerciales, y métodos automáticos comerciales). El perfeccionamiento y avance en los métodos automáticos comerciales con menor posibilidad de contaminación son la alternativa ideal. La eficiencia de los distintos métodos de extracción es muy variable y es uno de los aspectos que impiden la comparación de los diferentes estudios clínicos (197).

También varía el segmento del genoma elegido (DNA ribosómico, DNA mitocondrial) para su amplificación y el método para realizar ésta. No obstante, en los últimos años se ha desarrollado la PCR cuantitativa en tiempo real (PCR-TR), que presenta la ventaja de que el proceso de amplificación y detección se hace de forma simultánea en un vial cerrado. Esto disminuye la posibilidad de contaminación y permite cuantificar la carga fúngica (198).

La S, E, VPP y VPN de la detección de DNA fúngico en la sangre de los pacientes neutropénicos y/o sometidos a TPH es variable. En general, la mayoría de los estudios señalan una alta sensibilidad (75-100%), y por tanto un VPN por encima del 98%, aunque algunos estudios presentan porcentajes menores de S (36-66%), con VPN un poco inferiores (80-96%) (133, 150, 199, 200). Sin embargo, el principal problema es una moderada especificidad (65-96%) con un bajo VPP (15-68%) y un alto porcentaje de falsos positivos (tabla IV). Algunos estudios han señalado que los falsos positivos pueden no ser realmente falsos positivos sino representar infecciones subclínicas, ya que pacientes con PCR positivas y sin evidencia clínica de AI, desarrollaron AI posteriormente (201) .

Las diferencias de S, E, VPP y VPN en los distintos trabajos se relacionan con las diferentes técnicas usadas, tanto en el método de PCR (Nested PCR, PCR-ELISA, PCR-TR), como en la muestra empleada, sangre, plasma o suero.

Según Suarez et al el uso de un mayor volumen (1ml) de extracción de DNA permite aumentar la sensibilidad de la técnica al 100% sin afectar a otros parámetros, permitiendo, de esta forma, la detección de cantidades menores de DNA (154).

Recientemente se ha publicado un meta-análisis que incluye 16 estudios y que valora la técnica de PCR para el diagnóstico de la AI. evaluando conjuntamente estos estudios, la S y E de la técnica de PCR con dos resultados positivos fue del 75% (95% CI 0.54-0.88) y del 87% (95% CI 0.78-0.93), respectivamente. En cambio, para aquellos estudios que se admitió un sólo resultado de PCR positivo como criterio de AI, la S fue del 88% (95% CI 0.75-0.94) y la E del 75% (95% CI 0.63-0.84). Por tanto y en vista a estos resultados, una PCR negativa excluiría el diagnóstico de AI probada o probable, pero se precisarían dos resultados positivos para confirmar el diagnóstico de AI (202)

Tabla VII. Principales estudios prospectivos de la utilidad de la PCR para el diagnóstico de IF en pacientes oncohematológicos

Estudio	Diana	Hongo detectado	Técnica PCR ¹	Episodios ²	S ³	E ⁴	VPP ⁵	VPN ⁶
Hebart et al(2000) (188)	18S ADNr	<i>Asp spp</i> ⁷	1 PCR-Southern blot Sangre completa	84 TPH ⁸ alogénicos 7 AI	100%	65%	44%	100%
Hebart et al(2000) (203)	18S ADNr	<i>Asp spp</i> <i>Candida spp</i>	1 PCR-Southern blot Sangre completa	92 Episodios neutropenia febril o TPH alogénico 8 AI	100%	73%	-----	-----
Lass.Florl et al(2001) (204)	18S ADNr	<i>Asp spp</i>	2 PCR-ELISA Sangre completa	121 Episodios de neutropenia (O-Hemato y tumores sólidos)/TPH 3 AI	75%	96%	42%	98%
Buchheidt et al (2001) (205)	18 s ARNr	<i>Asp spp</i>	1 PCR Nested PCR Sangre completa	218 pac O-Hemato/TPH antólogo 33 AI	91,7%	81,3%	49,3%	98%
Jordanides et al (2005)(206)	18S ADNr	Panfúng ⁹	1 PCR-TR (Light Cycler®) Sangre completa	125 Episodios de neutropenia 8 AI	75%	70%	15%	98%
Kami et al (2001)(136)	18 S ADNr	<i>Asp spp</i>	1 PCR-TR (Light Cycler®) Sangre/Plasma	122 Episodios neutropenia O-Hemato 33 AI	79%	92%	-----	-----

Kawazu et al (2004) (199)	18 s ARNr	<i>Asp spp</i>	2 PCR-TR con TaqMan ¹⁰ Plasma	149 Episodios neutropenia 96 Pacientes O-Hemato/TPH alogénico 24 AI*	55%	93%	40%	96%
Buchheidt et al (2004) (133)	18s ARNr	<i>Asp spp</i>	2 Nested PCR S.completa	205 Pacientes O-Hemato/TPH 11 AI	36,4%	92,3%	-----	-----
Halliday et al(2006) (207)	18S ADNr	<i>Asp spp</i>	2 PCR.Sourther blot Sangre completa	95 Episodios neutropenia febril en LMA o TPH 13 AI	100%	75,4%	46,4%	100%
Florent et al (2006) (150)	Mt DNA ¹¹	<i>Asp fumigatus /flavus</i>	2 PCR-ELISA Suero	256 Episodios neutropenia (167 Pacientes O-Hemato) 51 AI*	51%	89,75%	68,5%	80,6%
White et al (2006)(208)	28s ARN	<i>Asp fumigatus</i>	2 PCR RT-PCR con TaqMan y Nested PCR Sangre completa	203 Pacientes O-Hemato/TPH alogénico También pediátricos 14 AI	92,3%	94,6%	60,0%	99,3%
Badiee et al (2008) (200)	18s DNAr	<i>Asp spp</i>	1 PCR-ELISA Sangre completa	194 Pac O-Hemato Tratamiento Quimioterapia 14 AI*	66%	96%	62,5%	97%
Suarez et al (2008) (154)	28s ARN	<i>Asp fumigatus</i>	1 PCR-TR (Light Cycler®) Suero	138 Episodios neutropenia (O-hemato) 17 AI*	100%	96,7%	81%	100%
Cesaro et al (2008) (209)	18s ARNr	<i>Asp spp</i>	2 PCR-TR (Light Cycler®) Suero	62 Pac pediátricos O-Hemato/TPH alogénico 8 AI	63%	81%	33%	94%

¹PCR: Reacción en cadena de la polimerasa Técnica y número de PCR requeridas para diagnóstico positivo; ² Pacientes incluidos en el estudio y número de pacientes diagnosticados de aspergilosis invasivas (AI); AI*: incluye AI posibles; ³S: Sensibilidad; ⁴E: Especificidad; ⁵VPP: Valor predictivo positivo; ⁶VPN: Valor predictivo negativo; ⁷Asp: Aspergillus; ⁸TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos; ⁹Panfun: Panfúngica; ¹⁰TaqMan Utiliza prueba de hidrólisis para tiempo real; ¹¹ mtDNA: DNA mitocondrial

Muchos de estos trabajos señalan, al igual que con el GM, que la positividad de la PCR precede a los síntomas clínicos de enfermedad y que, en hasta el 50% de los pacientes, es el primer marcador de AI, lo que permite adelantar el tratamiento antifúngico.

En el estudio de Herbart et al (188), la PCR precedía a la evidencia clínica con una media de 5,75 días (rango 0-14 días) en pacientes neutropénicos. Florent et al (150) observaron que en 8 de 12 pacientes con diagnóstico micológico o histológico, la PCR se adelantaba con una media de 16 días (rango 1-110 días) a dicho diagnóstico. Además, en 19 de 31 pacientes con TACAR positivo, la PCR se adelantaba una media de 8 días (rango 1-84 días). En el estudio de Badiee et al (200), la PCR precedió a los signos clínicos con una media de 12,6 días (rango 7-24 días).

En un estudio que comparaba la detección de ADN fúngico en sangre por PCR con la determinación de GM y BG de forma prospectiva en pacientes neutropénicos (136), se señaló que la positividad de la PCR antecede a la positividad del GM y del BG, siendo el marcador microbiológico más precoz. En el estudio de Florent et al (150), la PCR se adelantaba al GM en 12 de 38 pacientes, con una media de 17 días (4-63) y en 11, la PCR se positivizaba al mismo tiempo que el GM.

Pocos estudios han utilizado la técnica de PCR-TR para detectar *Aspergillus* spp. (136, 154, 199, 208, 209) y de ellos, sólo dos realizan determinaciones seriadas en sangre o en suero (154, 208), aunque el trabajo de Suarez sólo realiza una determinación de PCR semanal en suero, lo que puede disminuir la rentabilidad de la técnica y considera un resultado positivo con una sólo PCR positiva (154).

Por otra parte, la utilización de la PCR en LBA y muestras de tejido, aunque parece no ser un marcador precoz de enfermedad, sí que es más sensible que los métodos de cultivo convencionales para el diagnóstico de AI. La utilización

conjunta del GM y de la PCR cuantitativa en LBA de pacientes con AI podría evitar la realización de biopsias (177) .

En un estudio reciente, la realización de PCR conjunta en sangre y LBA de pacientes con AI, señaló una mayor S y E de la PCR en LBA frente a sangre para el diagnóstico de la AI (190). Además en la AI experimental, la PCR cuantitativa en LBA permitió cuantificar la carga fúngica en el árbol traqueobronquial y el riesgo de AI (210), lo que podría usarse en la práctica clínica diaria para iniciar tratamiento antifúngico anticipado en pacientes con altas cargas fúngicas.

El diagnóstico definitivo de AI requiere de la confirmación histológica de invasión tisular por hongos filamentosos, sin embargo sólo en un 30-50% de los pacientes con evidencia histológica de AI es posible cultivar *Aspergillus* spp. (211). La utilización de técnicas de PCR en tejido son más sensibles que el cultivo convencional en el diagnóstico de la AI experimental (212), por lo que su utilización en la clínica podría aumentar el porcentaje de detección de la AI.

HIPÓTEIS PRINCIPAL

La detección en sangre o suero de ácidos nucleicos de *Aspergillus fumigatus* mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real permitirá mejorar y adelantar el diagnóstico de la infección fúngica invasiva en enfermos hematológicos con alto riesgo de aspergilosis.

HIPÓTESIS SECUNDARIAS

1. La PCR cuantitativa en tiempo real para la detección de ácidos nucleicos de *Aspergillus fumigatus*, puede emplearse en muestras clínicas de sangre o suero para mejorar y adelantar el diagnóstico de infección fúngica invasora en el paciente onco-hematológico.

2. El uso conjunto de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real para la determinación de DNA de *Aspergillus fumigatus* (en pacientes hematológicos con alto riesgo de infección fúngica invasiva) y de la técnica antigénica de GM permitirá incrementar el valor predictivo de ambas técnicas en el diagnóstico de la aspergilosis.

OBJETIVOS

1. Validación de la técnica de PCR-TR para *Aspergillus fumigatus*, evaluando la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, en muestra de sangre o suero, de pacientes con patología hematológica y alto riesgo de micosis.
2. Valorar si la determinación de ADN fúngico de *Aspergillus fumigatus* mediante PCR-TR puede considerarse como una técnica diagnóstica fiable, con porcentajes de acierto comparables a los del TACAR o la detección de antígenos fúngicos.
3. Determinar si la cuantificación de ADN fúngico mediante la técnica de PCR-TR, sirve para establecer puntos de corte que ayuden a distinguir entre pacientes colonizados o infectados.
4. Calcular la correlación temporal de los resultados de la PCR-TR para *Aspergillus fumigatus* con los datos clínicos, radiológicos y la cuantificación antigénica de GM, para determinar la utilidad diagnóstica real de la PCR-TR, así como la precocidad diagnóstica de la misma
5. Valorar el uso conjunto de la técnica antigénica de GM y PCR-TR para el diagnóstico precoz de la infección fúngica en el paciente hematológico de alto riesgo, evaluando sensibilidad y especificidad conjunta y valor predictivo diagnóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Desde el 1 de octubre del 2004 al 15 de noviembre del 2005, se recogieron, de forma prospectiva, las muestras de sangre y suero de los pacientes ingresados en la planta de Hematología y en la Unidad de Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Se incluyeron en el estudio todos aquellos pacientes sometidos a tratamiento quimioterápico, que presentaban neutropenia febril o eran receptores de TPH y presentaban alto riesgo de infección fúngica invasiva. Cada paciente podía tener uno o varios episodios de neutropenia febril con el consiguiente riesgo de infección fúngica.

Fueron estudiados un total de 83 enfermos con neutropenia febril (<500 neutrófilos/ μ l y $>38^{\circ}\text{C}$) o sometidos a TPH, considerados de alto riesgo para sufrir aspergilosis invasiva. Se recogieron de forma prospectiva los datos clínicos, radiológicos y microbiológicos y posteriormente se hizo un estudio retrospectivo valorando todos los episodios de neutropenia en conjunto de cada paciente. Se excluyeron del estudio aquellos pacientes que no recibían quimioterapia.

Se tomaron dos muestras semanales de sangre y suero durante los episodios de neutropenia febril. Se realizó determinación de GM en estas muestras y, además, se remitieron al Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, para la realización de la técnica de PCR-TR para *Aspergillus fumigatus*. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

Los pacientes fueron seguidos hasta el 31 de marzo del 2006. Las variables clínicas analizadas fueron: enfermedad de base, sexo, edad, duración de la neutropenia en días, uso de esteroides, profilaxis antifúngica o tratamiento,

tratamiento de la enfermedad hematológica maligna con quimioterapia o trasplante de progenitores hematopoyéticos, tipo de trasplante alogénico o autólogo, tipo de aspergilosis y el resultado final como curación o muerte.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital y se solicitó un consentimiento informado a cada uno de los pacientes.

Definición de los episodios de riesgo

Se incluyeron sólo aquellos pacientes y episodios de alto riesgo de infección fúngica. Según la enfermedad de base y el tratamiento administrado, los episodios de tratamiento con quimioterapia eran clasificados en episodios de bajo o alto riesgo de AI atendiendo a los criterios EORTC-MSG (84) modificados en relación al paciente onco-hematológico y basados en la experiencia clínica diaria.

Se definió episodio de alto riesgo de AI aquel que cumplía alguna de las siguientes condiciones: LMA, SMD, TPH alogénico, neutropenia esperable $< 500/\mu\text{l}$ neutrófilos superior a 10 días; episodios con neutrófilos $< 500/\mu\text{l}$ > 5 días y tratamiento corticoesteroideo con dosis de prednisona (o equivalente) > 500 mg en el mismo episodio; episodios con coexistencia de neutropenia (neutrófilos $< 500/\mu\text{l}$) de cualquier duración y tratamiento con alemtuzumab y/o fludarabina en los últimos 6 meses y episodios con coexistencia de neutropenia (neutrófilos $< 500/\mu\text{l}$) de cualquier duración y otros tipos de inmunosupresión celular (pacientes con trastornos linfoproliferativos postrasplante, pacientes con Infección VIH y $\text{CD4} < 200/\mu\text{l}$ y pacientes con Linfomas T). El resto de los episodios eran considerados de bajo riesgo de AI. (Tabla VIII).

Se realizó esta clasificación de pacientes en alto y bajo riesgo acorde a la experiencia clínica del grupo investigador, habiendo comprobado en estudios previos, que si el enfermo era clasificado con dichos criterios como de alto riesgo, la probabilidad de desarrollar AI se multiplicaba casi por 4 y si era clasificado como

de bajo riesgo mediante dichos criterios, la probabilidad de desarrollar AI era casi 3 veces menor (213).

Tabla VIII. Clasificación de los episodios según el riesgo de AI

Alto riesgo AI	Bajo riesgo AI
<ul style="list-style-type: none"> ▪ LMA ▪ SMD ▪ TPH alogénico. ▪ Neutropenia < 500/μl durante > 10 días. ▪ Neutropenia < 500/μl durante > 5 días y > 500 mg de prednisona o equivalente en episodio. ▪ Neutropenia < 500/μl de cualquier duración y tratamiento con alemtuzumab y/o fludarabina en los últimos 6 meses. ▪ Neutropenia < 500/μl de cualquier duración en pacientes con infección VIH con CD4 < 200 /mm³ ▪ Neutropenia < 500/μl de cualquier duración en pacientes con linfoma postrasplante. ▪ Neutropenia < 500/μl de cualquier duración en pacientes con Linfomas T. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ No cumple ninguno de los criterios anteriores.

Determinación de GM

Se extrajeron dos veces por semana una muestra de 5 ml de sangre total en tubo seco desde el inicio de la quimioterapia hasta la resolución de la neutropenia. La determinación de GM se realizó con *Platelia Aspergillus Bio-Rad®*. Las técnicas de procesamiento de la muestra y las medidas de la densidad óptica (DO) se realizaban de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Se consideraba un resultado positivo si 2 muestras consecutivas presentaban un índice de DO $\geq 0,5$, ó una muestra presentaba un índice de DO $\geq 0,8$.

Determinación de PCR

Se realizó igualmente determinaciones de PCR-TR para *A. fumigatus* dos veces por semana en muestra de sangre y suero. La recogida bisemanal de muestras fue prospectiva, aunque la determinación de PCR-TR se hizo posteriormente de forma retrospectiva sin conocer dicho resultado durante el seguimiento del paciente. Se consideró la técnica de PCR-TR como positiva cuando se obtuvieron dos o más resultados positivos consecutivos en menos de una semana o tres o más resultados positivos consecutivos en menos de 12 días.

Técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (PCR-TR)

Se diseñó una pareja de iniciadores y una sonda del tipo Molecular Beacon específicos para *A. fumigatus* dirigidos al ADN ribosómico, en concreto a la región ITS1 (Internal Transcriber Spacer 1). Para el diseño de los iniciadores y de la sonda se analizaron las secuencias de las regiones ITS (Internal Transcriber Spacers) del ADN ribosómico de 24 cepas de *A. fumigatus* disponibles en el Servicio de Micología. El diseño de los iniciadores y de la sonda se realizó con la ayuda del programa de diseño de sondas Beacon Design 5.0 (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, EE.UU.). El iniciador directo era OliAFMB1 5' TCCCACCCGTGTCTATCG 3' y el reverso era OliAFMB2 5' GAACCAAGAGATCCGTTGTTG 3'. La sonda Molecular Beacon se marcó en el extremo 5' con el fluoróforo FAM y en el extremo 3' con el *quencher* o apagador BHQ1, y su secuencia fue:

5' FAM CGCGATCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGATCGCG BHQ1 3'.

Se realizó un estudio para conocer la especificidad de la secuencia elegida para los iniciadores y en la sonda. En este estudio de especificidad se utilizó ADN de cepas pertenecientes a otras especies del género *Aspergillus* así como de cepas pertenecientes a otras especies de hongos filamentosos que causan infecciones fúngicas invasoras. Estas especies son: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*,

Aspergillus niger, *Fusarium solani*, *Fusarium verticilloides*, *Fusarium oxysporum*, *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium prolificans* y *Rhizopus oryzae*.

Además se incluyeron en los experimentos ADN genómico humano y de ratón (Promega, Madrid, Spain). Una vez diseñados los iniciadores y las sondas, se realizó una búsqueda de tipo BLAST en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>) para estar seguros de que las sondas diseñadas no presentaban homología con otros microorganismos.

Adicionalmente, se comprobó la especificidad de la sonda y de los iniciadores diseñados mediante análisis filogenéticos de sus secuencias. Para estos análisis se utilizó la base de datos de secuencias del Servicio de Micología, que dispone de 4.000 cepas pertenecientes a 270 especies fúngicas y el programa informático Fingerprinting II informatix, versión 3.0 (BIORAD, Madrid, España).

La extracción de ADN a partir de las muestras se realizó empleando el kit QiaampDNA Mini Kit (Qiagen, Izasa, Madrid, España). Se emplearon 2 µl del ADN extraído de cada muestra para cada reacción de PCR-TR. Las reacciones de PCR-TR contenían un volumen final de 20 µL, con 3mM de Cl₂Mg, 0,5 µM de cada iniciador y 0,4 µM de sonda Molecular Beacon. Se realizó una preincubación a 95°C seguida de 45 ciclos de desnaturalización (15s a 95°C), anillamiento (30s a 56°C), y extensión (5s a 72°C).

Cada experimento se realizó por duplicado y se incluyeron controles negativos, controles de inhibición de la reacción de PCR y un control positivo (214). Para este último se utilizó ADN de la cepa de *A. fumigatus* CNM-CM-237 (Colección de hongos filamentosos del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología).

Se consideró resultado positivo cuando se detectó un aumento exponencial de la fluorescencia, con respecto a los controles negativos, antes del ciclo 40 de amplificación. El límite de detección se situó en 10 fg de DNA por μL de muestra.

En los casos en que se obtuvo un resultado positivo, se verificó la presencia de un amplicón de 185 pb mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los fragmentos amplificados se secuenciaron en el sistema ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystem, Madrid, España) y sus secuencias se compararon con las bases de datos disponibles en el laboratorio, para asegurar que se trataba de *A. fumigatus*.

La cuantificación del ADN amplificado se realizaron mediante la construcción de rectas de regresión con los resultados de cinco repeticiones de diferentes diluciones de ADN del *A. fumigatus* CNM-CM-237 (desde 10 ng a 1 fg DNA/ μL). Las rectas de regresión se realizaron entre los logaritmos de las concentraciones de ADN y el ciclo de la reacción de PCR en el que se empezaba a detectar la fluorescencia (crossing point, C_t). La recta de regresión construida entre las concentraciones conocidas de ADN y los C_t tenía un coeficiente de determinación (r^2) de 0,99 ($P < 0.01$). La reproducibilidad del ensayo fue muy elevada siendo la media de los coeficientes de variación del 2,8%.

Tomografía axial computerizada de alta resolución (TACAR)

En todos los pacientes con neutropenia febril persistente, GM positivo en dos determinaciones consecutivas, examen en fresco o cultivo positivo para hongos filamentosos en muestras no invasivas (esputo o exudado nasal) o Rx de tórax anormal se realizaba un TACAR con una demora no superior a 4 días desde el hallazgo clínico, microbiológico y/o radiológico.

Pruebas invasivas

En los pacientes con TACAR patológico se indicaba una broncoscopia con lavado broncoalveolar (LBA) y/o biopsia transbronquial (BTB), salvo contraindicación clínica.

La muestra obtenida de LBA se procesaba para gram y cultivo bacteriano, tinción Ziehl-Nielsen y cultivo de micobacterias, tinción para *Pneumocystis jiroveci*, cultivo de virus y examen directo y cultivo de hongos. En caso de obtención de biopsia transbronquial se procesaba para cultivo de hongos y examen anatomopatológico con tinciones específicas para hongos en los tejidos.

Seguimiento clínico

Diariamente se vigilaba la presencia de fiebre (temperatura > 38 °C) y la presencia de síntomas (tos, expectoración, hemoptisis, disnea) y signos (hipoventilación, crepitantes, roce pleural, lesiones cutáneas) de AI.

En caso de neutropenia febril se solicitaba Rx Tórax, dos hemocultivos y urocultivo. En pacientes con foco pulmonar se procesaba un exudado nasofaríngeo para cultivo viral y un exudado nasal y un esputo para examen directo y cultivo de hongos. En todos los casos se iniciaba tratamiento antibiótico empírico con meropenem o imipenem o cefepime más amikacina.

En pacientes con mucositis grado IV, shock séptico o foco infeccioso en catéter se añadía tratamiento con vancomicina o teicoplanina. En el resto de los pacientes no estaba indicado su uso a pesar de la persistencia de la fiebre, salvo documentación microbiológica (bacteriemia por cocos grampositivos). En pacientes con neutropenia febril y diarrea se solicitaba la determinación de toxina de *Clostridium. difficile* y se iniciaba tratamiento empírico con metronidazol.

Pautas de profilaxis

En los pacientes sometidos a TPH y en los episodios con neutropenia esperable < 500 neutrófilos/mm³ superior a 10 días y/o mucositis > grado 3-4 se iniciaba tratamiento profiláctico antibacteriano (ciprofloxacino 500 cada 12 horas vía oral), desde 5 días antes del inicio de la neutropenia hasta su recuperación o la instauración de tratamiento antibacteriano empírico por neutropenia febril.

Los pacientes que recibían tratamiento con prednisona > 1mg/kg/peso durante > 10 días o habían sido tratados con alemtuzumab y/o fludarabina en los últimos 6 meses recibían tratamiento de profilaxis para *Pneumocystis jiroveci* con cotrimoxazol (800/160 mg) tres veces por semana.

En todos los pacientes por ser considerados de alto riesgo para AI se iniciaba profilaxis antifúngica con itraconazol. En todos los casos se administraba una dosis de choque de itraconazol (200 mg/12 horas) por vía intravenosa durante 1-2 días y posteriormente se iniciaba tratamiento con solución oral a dosis de 200 mg cada 12 horas. En caso de intolerancia por vía oral, se administraba itraconazol (200 mg/24 horas) por vía intravenosa. El tratamiento se iniciaba 3-5 días antes del inicio de la neutropenia hasta su recuperación o la instauración de tratamiento antifúngico empírico o dirigido.

Se realizaba profilaxis antifúngica secundaria en los episodios de riesgo de pacientes con AI previa, indicándose tratamiento con voriconazol a dosis de 4 mg/kg/12 horas, itraconazol a dosis de 200 mg /12 h vía oral, anfotericina B liposomal (3-5 mg/kg) o caspofungina (50 mg/día).

Sólo se indicaba profilaxis antivírica en pacientes sometidos a TPH. En los TPH autólogo con aciclovir a dosis de 800 mg/12 horas desde el acondicionamiento hasta 30 días postrasplante. En los TPH alogénicos se indicaba ganciclovir

(5mg/kg/12 horas) hasta el injerto y posteriormente aciclovir 800 mg/12h hasta 30 días postrasplante.

Tratamiento antifúngico

Se indicaba tratamiento antifúngico dirigido en pacientes con galactomanano positivo, en pacientes con TACAR patológico o si se detectaba *A. fumigatus* en LBA o la presencia de hifas en la BTB y el TACAR no era excluyente de AI. El tratamiento antifúngico empírico sólo se indicaba en estos pacientes de alto riesgo cuando presentaban neutropenia febril persistente.

Definiciones

Aspergilosis invasiva

La AI fue definida y clasificada según los criterios de la EORTC/MSG publicados por Ben De Pauw et al. (84) que establece 3 grados de certeza: probada, probable o posible (Tabla IX).

Criterios EORTC-MSG 2008 para el diagnóstico de AI	
AI Probada	Pacientes con evidencia histológica, citopatológica o visión microscópica directa de hifas en el tejido obtenido por biopsia o por punción aspiración con daño tisular asociado o cultivo positivo para <i>Aspergillus</i> spp. de una muestra de un lugar habitualmente estéril, de un órgano afectado clínica o radiológicamente excluyendo mucosas, orina, cavidad sinusal, LBA o sangre (se asume contaminación)
AI probable	Pacientes con factores de riesgo* de AI (criterio huésped) además de evidencia clínica** de AI y con documentación microbiológica*** de infección por <i>Aspergillus</i> spp. (Todo los criterios coincidentes en el tiempo)
AI posible	Pacientes con factores de riesgo* de AI y evidencia clínica** de AI sin documentación microbiológica.
<p>*Factores de riesgo de AI (Factor huésped):</p> <ul style="list-style-type: none"> • Historia reciente de Neutropenia < 500/mm³ durante > 10 días relacionada en el tiempo con la aparición de AI. • Ser receptor de un TPH alogénico. • Uso prolongado de tratamiento corticoideo (excluyendo pacientes con aspergilosis broncopulmonar alérgica) con una dosis media de 0,3mg/Kg/día equivalente a prednisona durante > 3 semanas. • Tratamiento con cualquiera del resto de tratamientos reconocidos como inmunosupresores de linfocitos T, como ciclosporina, bloqueantes TNF-α, anticuerpos monoclonales específicos (como alemtuzumab) o análogos de nucleósido durante los últimos 90 días. • Inmunodeficiencia severa congénita (como enfermedad granulomatosa crónica o inmunodeficiencia combinada severa) 	
<p>**Criterio clínico de AI:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad fúngica del tracto respiratorio bajo Presencia de uno de los tres siguientes signos radiológicos en el TAC: <ol style="list-style-type: none"> 1. Condensación, lesión bien circunscrita con o sin signo del halo 2. Signo de la media luna 3. Lesión cavitada • Traqueobronquitis Úlcera, nódulo, pseudomembrana o placa necrótica traqueobronquial en el análisis broscópico. • Infección sinusal Imagen sugerente de sinusitis + al menos 1 de los siguientes signos: <ol style="list-style-type: none"> 1. Dolor agudo localizado (incluido dolor irradiado al ojo) 2. Úlcera nasal con placa necrótica 3. Extensión desde el seno paranasal a través del hueso, incluyendo afectación orbitaria. • Infección del SNC: 1 de los 2 siguientes signos: <ol style="list-style-type: none"> 1. Lesión focal en una prueba de imagen 2. Engrosamiento meníngeo en el TAC o RMN 	

****Criterio microbiológico de AI:**

- Test directos, pruebas diagnósticas microbiológicas invasivas (citología, microscopio directo o cultivo):
 1. Presencia de elementos fúngicos de *Aspergillus* spp.
 2. Cultivo positivo para *Aspergillus* spp.
- Test indirectos, pruebas diagnósticas microbiológico no invasivas:
 1. Galactomanano positivo en plasma, suero, LBA o LCR
 2. β -D-glucano detectado en suero

Tabla IX. Criterios EORTC-MSG para el diagnóstico de la AI.

Adaptada de Ben De Pauw et al (84)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la recogida prospectiva de los datos epidemiológicos, clínicos, microbiológicos y radiológicos, se diseñó una base de datos con el programa Microsoft® Access para Windows. El diseño del estudio es una cohorte prospectiva de episodios de tratamiento con quimioterapia en pacientes con neoplasias hematológicas y de alto riesgo para IFI.

La información recogida de cada paciente, así como los resultados de la PCR fueron incluidos posteriormente en una base de datos (SPSS 15.0, SPSS Ibérica S.L., Madrid, España). Las definiciones de aspergilosis probada, probable y posible se realizaron según las definiciones de la EORTC/MSG publicados en el 2008 (84).

Las variables continuas se definieron mediante la media, mediana, intervalo de confianza (IC) y se compararon mediante tests no paramétricos. Las variables discretas se definieron con su frecuencia y sus diferencias se analizaron mediante el test de la X^2 o el de Fisher si alguno de los valores esperados era menor de 5.

Para el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las determinaciones de PCR, se emplearán procedimientos rutinarios y tablas de cálculo de 2x2.

Se evaluó la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la técnica de PCR con un resultado positivo, dos o más resultados positivos consecutivos en menos de una semana y tres o más resultados positivos consecutivos en menos de 12 días. Se calcularon los porcentajes de aciertos, de falsos positivos y de falsos negativos con cada uno de los criterios antes mencionados.

En los pacientes con PCR positiva, se cuantificó la cantidad de DNA en cada muestra positiva, con la intención de analizar la cinética del ácido nucleico y hallar posibles relaciones entre el *Ct* y la evolución clínica de los enfermos.

Se realizó un análisis de la clase *data mining* utilizando el programa CART v 5.0 (Correlation and Regression Trees, Salford Systems, San Diego, CA). CART es una herramienta informática que trabaja con modelos predictivos y árboles de decisión que permiten identificar tendencias, relaciones y patrones ocultos en bases de datos complejas. CART se caracteriza por realizar análisis binarios, autovalidación automática de los modelos propuestos e identificación de variables o marcadores significativos.

La representación del test diagnóstico se realizó considerando el número de casos correctamente clasificados, así como aquellos clasificados de forma incorrecta por la técnica diagnóstica de la PCR. La representación de la probabilidad diagnóstica del test fue expresada como el porcentaje de verdaderos positivos (sensibilidad) y falsos positivos (1-especificidad) y se representó mediante *receiver operator curves* (ROC). Se consideró estadísticamente significativo una $P < 0.01$

RESULTADOS

Pacientes

De los 83 pacientes incluidos en el estudio, un total de 12 enfermos, siete hombres y cinco mujeres, fueron diagnosticados de AI según los criterios EORTC/MSG del 2008 (84), lo que constituye una prevalencia de 14.4%. Una aspergilosis fue clasificada como probada, nueve como probables y dos como posibles. En la tabla X se recogen los principales datos clínicos de los enfermos diagnosticados de aspergilosis, así como el resultado del TACAR y de las determinaciones de GM.

Las enfermedades de base de los 83 enfermos incluidos en el estudio eran 28 linfomas no Hodgkin (LNH), 21 leucemias agudas mieloblásticas (LAM), diez leucemias agudas linfoblásticas (LAL), siete leucemias linfáticas crónicas (LLC), siete mielomas múltiples (MM), seis enfermedades de Hodgkin (EH), tres síndromes mielodisplásicos (SMD) y una aplasia medular. La edad media de estos pacientes era de 52 años, 48 eran hombres y 35 eran mujeres.

Las enfermedades de base más frecuentes de los 12 enfermos con AI, fueron LAM y LAL, con seis (50%) y tres (25%) casos respectivamente. Tres enfermos (25%) sufrieron un trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (TPH). Diez pacientes (83%) estaban en profilaxis con itraconazol.

Once enfermos de los 12 pacientes con AI, presentaban signos radiológicos de infección fúngica en el TACAR y uno tenía signos radiológicos de infección sinonasal. Nueve individuos (75%) tenían GM positivo.

De los 83 pacientes, aparte de los 12 enfermos diagnosticados de AI, dos pacientes presentaron infección fúngica de etiología distinta a la aspergilosis. Un enfermo sufrió una candidiasis diseminada y otro fue diagnosticado de zigomicosis.

Tabla X. Datos demográficos, radiológicos y microbiológicos de los pacientes con aspergilosis invasiva.

Paciente	Género	Enfermedad hematológica ⁽¹⁾	Diagnóstico	Profilaxis	TACAR ⁽³⁾	GM ⁽⁵⁾	PCR ⁽⁷⁾	Días que precede TACAR ⁽⁸⁾	Días precede a GM ⁽⁹⁾
Paciente 1	Hombre	LAL	Aspergilosis probada ⁽²⁾	Fluconazol/ Itraconazol	Positivo	Positivo	Positivo	67	65
Paciente 2	Hombre	LNH	Aspergilosis probable	No	Positivo	Positivo	Positivo	0	0
Paciente 3	Mujer	LAM	Aspergilosis probable	Itraconazol	Positivo	Positivo	Positivo	-27	-28
Paciente 4	Mujer	LAM	Aspergilosis probable	Itraconazol	Positivo	Positivo	Positivo	61	199
Paciente 5	Mujer	MM	Aspergilosis probable	Fluconazol	Negativo ⁽⁴⁾	Positivo	Positivo	0	0
Paciente 6	Hombre	LAM	Aspergilosis probable	Itraconazol	Positivo	Positivo	Positivo	1	37
Paciente 7	Hombre	LAL	Aspergilosis probable	Itraconazol	Positivo	Negativo ⁽⁶⁾	Positivo	84	79
Paciente 8	Mujer	LAM	Aspergilosis probable	Itraconazol	Positivo	Positivo	Positivo	19	107
Paciente 9	Hombre	LAL	Aspergilosis probable	Itraconazol	Positivo	Positivo	Positivo	90	154
Paciente10	Mujer	LAM	Aspergilosis probable	Itraconazol	Positivo	Positivo	Negativo	NC ⁽¹⁰⁾	NC
Paciente11	Hombre	SMD	Aspergilosis posible	Itraconazol	Positivo	Negativo	Positivo	-69	NC
Paciente12	Hombre	LAM	Aspergilosis posible	Itraconazol	Positivo	Negativo	Positivo	8	NC

1: LAL: Leucemia aguda linfoblástica; LNH: Linfoma no hodgkin; LMA: Leucemia aguda mieloblástica; MM: Mieloma múltiple; SMD: Síndrome mielodisplásico. 2: Aspergilosis probada por biopsia. 3: Tomografía axial computada de alta resolución. 4: Paciente diagnosticado de aspergilosis sinusal, TAC con imagen de sinusitis. 5: GM: galactomanano. 6: Paciente diagnosticado por esputo con cultivo positivo para *A. fumigatus*. 7: Se tiene en cuenta dos (en < de 10 días) o más resultados positivos. (8): Tiempo en días que precede el resultado de PCR al TACAR, un signo negativo significa que el DNA fúngico fue detectado más tarde que el signo radiológico. 9: Tiempo en días que precede el resultado de PCR al GM, un signo negativo significa que el DNA fúngico fue detectado más tarde que el GM; en el Paciente 7, el cálculo se realizó acorde con la fecha del cultivo de esputo positivo. 10: NC: No calculado

GRÁFICOS DE LOS PACIENTES CON AI y PCR positiva

Hemos realizado resúmenes de los 12 pacientes diagnosticados de AI y gráficos de aquellos 11 pacientes con AI y PCR positiva. De esta forma se puede ver de forma resumida la evolución de cada paciente, los episodios de riesgo, el número de GM y PCR positivas, el momento del diagnóstico de AI y de una forma gráfica cuánto antecede la PCR al diagnóstico del GM y TACAR, en aquellos pacientes en los que existió precocidad diagnóstica con la técnica de PCR-TR.

Resumen de cada paciente con su gráfica:

Paciente 1

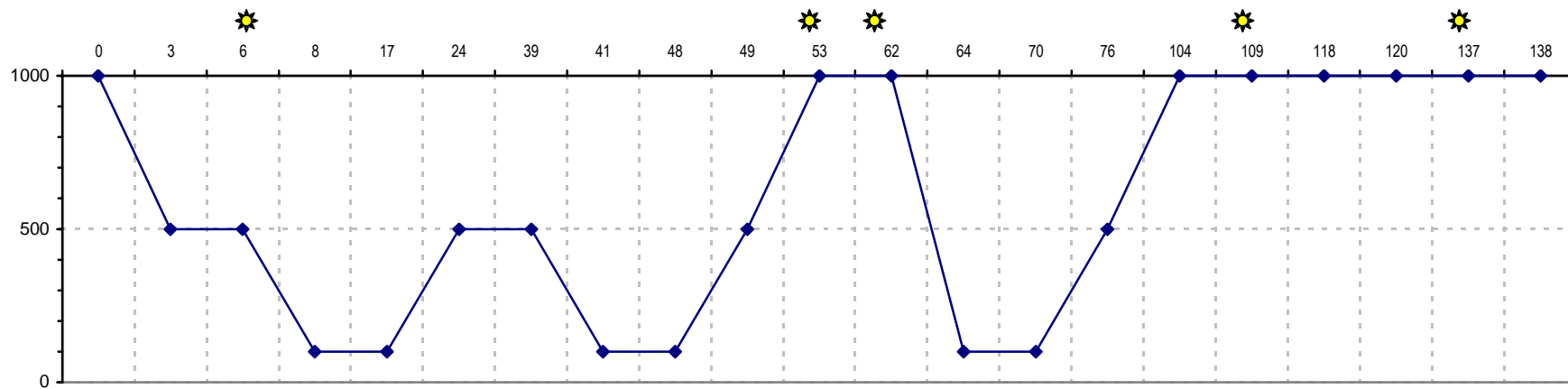
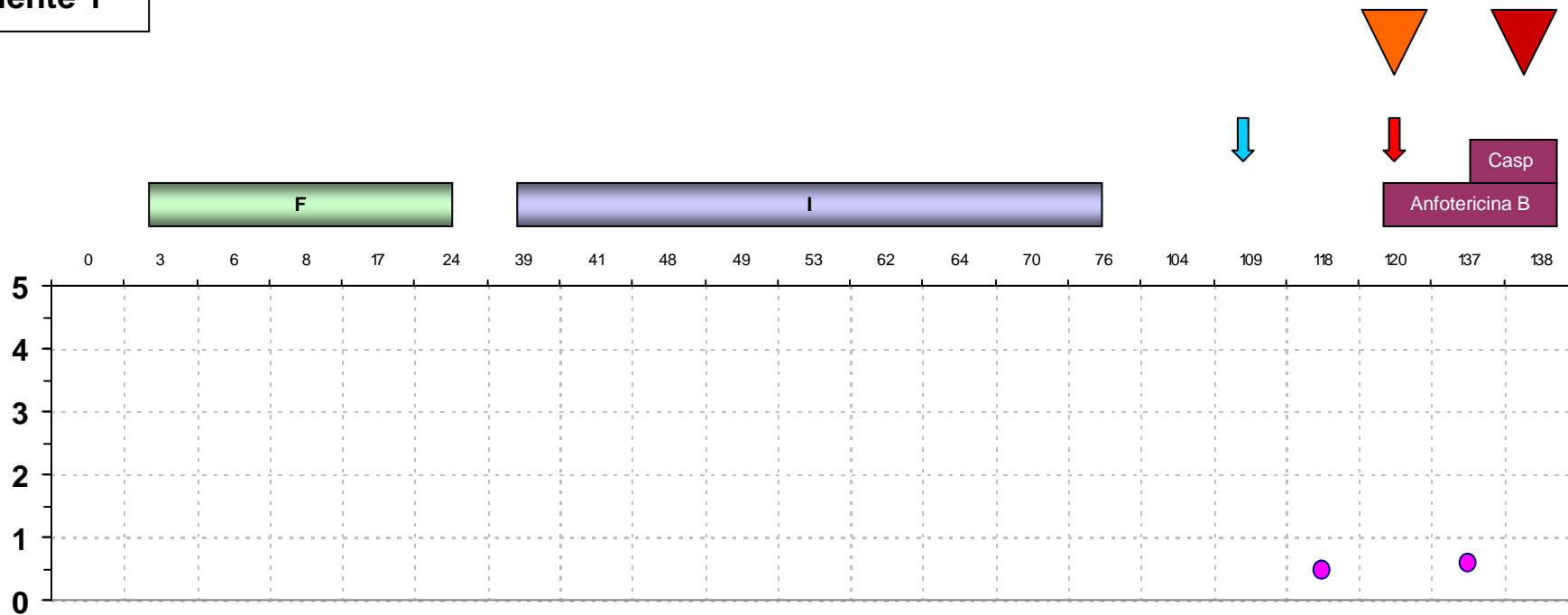
Varón de 37 años

Leucemia aguda linfoblástica (LAL)

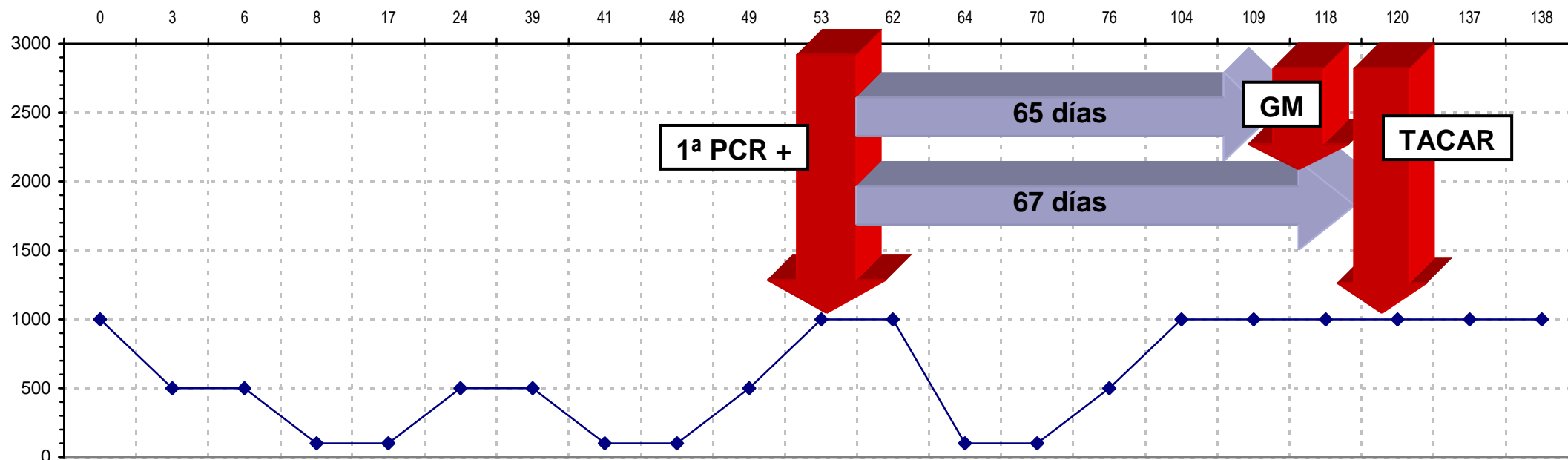
- Ingresa del día 0 al día 23 para tratamiento de inducción (según protocolo PHETEMA del 2003 (Programa de estudio y tratamiento de las Hemopatías Malignas) de LAL de alto riesgo para adultos con vincristina, daunorrubicina y prednisona además de tratamiento intratecal (metrotexato, citarabina (Ara-C), hidrocortisona)
- Posteriormente del día 32 al día 40 y del día 54 al día 58 recibe tratamiento de consolidación tras remisión completa
- Se administró una dosis total de corticoides de 6150 mgr.
- Neutropenia < 500/ μ l (20, 10 y 12 días en cada ciclo respectivamente) y < 100/ μ l (9,7 y 6 días respectivamente)
- El paciente presenta fiebre intermitente desde el inicio de los ciclos de quimioterapia, fiebre el día 14 y 15, del día 44 al 46 y del día 66 al 71 con buena respuesta a tratamiento antibiótico
- Nuevo ingreso el día 104 para tercer bloque de consolidación, pero comienza con fiebre sin neutropenia y se decide no iniciar quimioterapia (fiebre del día 104 al 138)

- Se inicia por la fiebre y la imagen del TAC tratamiento con anfotericina B y en los últimos días caspofungina por empeoramiento
- TAC IFI: TAC abdominal con lesiones nodulares en “ojo de buey”
- *Exitus* el día 138 por distrés respiratorio, progresión de su leucemia y síndrome hemofagocítico
- Necropsia: *A. fumigatus* en biopsia hepática

Paciente 1



Paciente 1



Varón de 37 años con LAL, recibe tratamiento (tto) de inducción y dos ciclos de consolidación tras remisión completa (RC), ingresa el día 104 para tercer ciclo de consolidación, pero empieza con fiebre y posteriormente se diagnostica de IFI probable el día 120 por TAC y GM. La PCR ya había sido positiva 65 días previamente al GM y 67 al TACAR. *Exitus* el día 138 en necropsia dto IFI probada.

Paciente 2

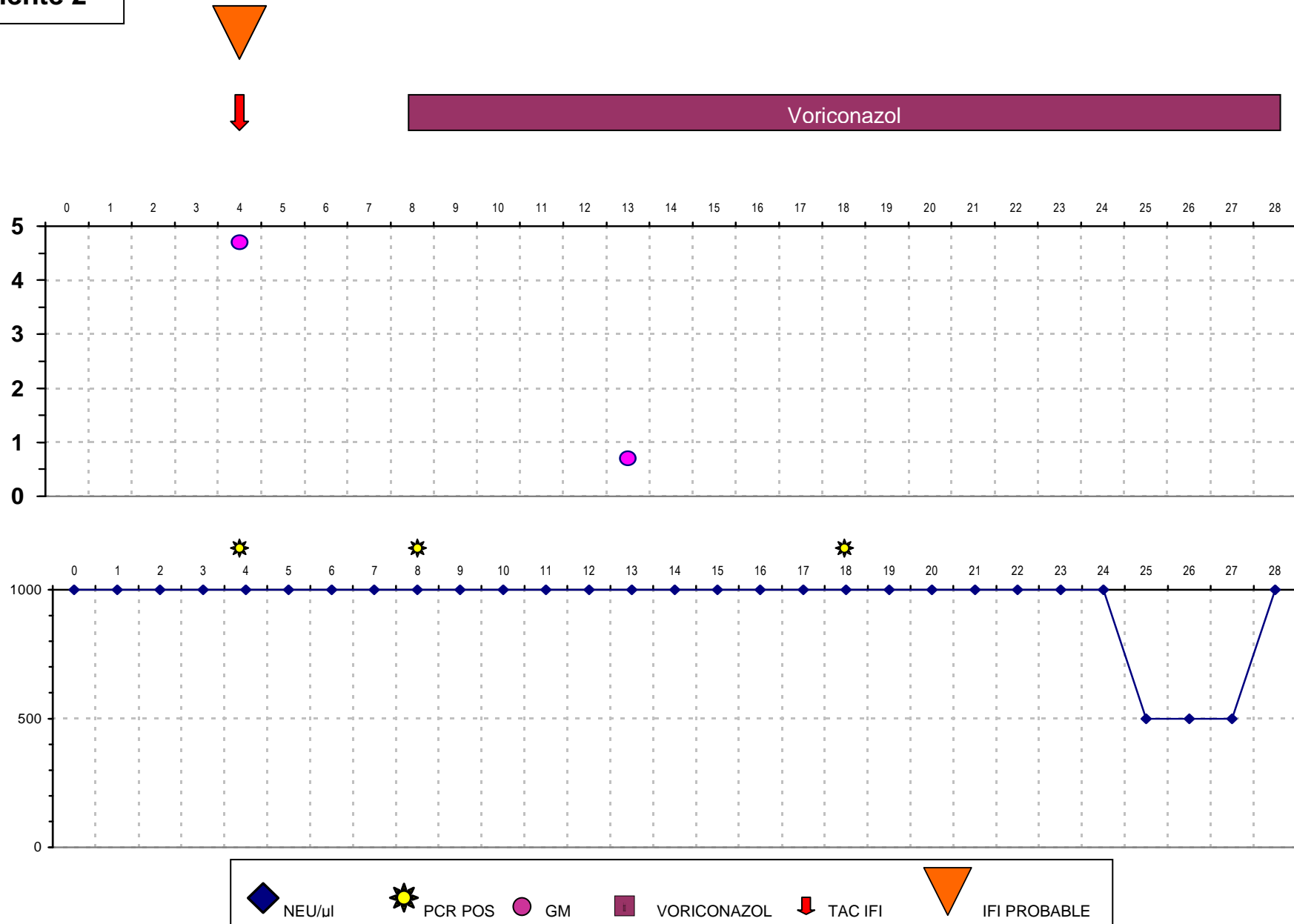
Linfoma no Hodgkin (LNH)

Varón de 23 años

Linfoma postrasplante cardíaco en 1996, en tratamiento actual con ciclosporina e imurel

- Ingreso el día 0 iniciándose ciclo de quimioterapia de inducción el día 13 con R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona) quedando en remisión completa
- Corticoides: dosis total 700mg
- Neutropenia < 500/ μ l, 2 días
- Fiebre del día 25 al 27
- Imagen en TAC de IFI el día 4: Infiltrado nodular circunscrito en lóbulo inferior izquierdo
- Fue un escape de profilaxis. Se trató con voriconazol por IFI probable (imagen de TAC y GM positivo)
- Posteriormente el paciente clínicamente asintomático y no más ingresos de etiología infecciosa

Paciente 2



Paciente con LNH y tto con ciclosporina por trasplante cardiaco previo, escape de profilaxis, ingreso para inicio de tto R-CHOP. IFI desde inicio, día 4, con GM, TACAR y PCR positivos a igual tiempo. Posteriormente paciente en RC.

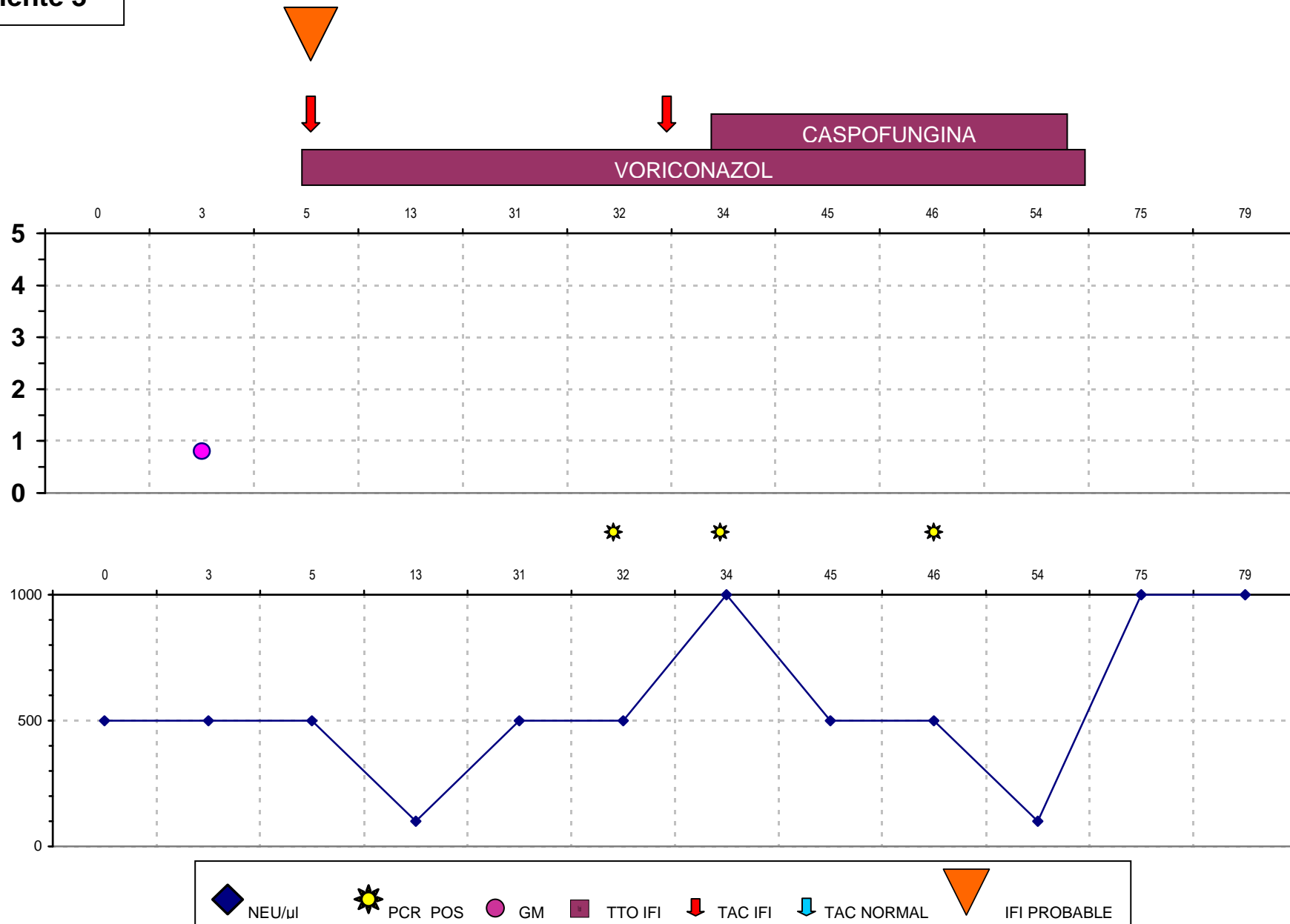
Paciente 3

Leucemia aguda mieloblástica (LAM)

Mujer de 63 años

- Ingresa el día 0 para tratamiento de inducción con idarrubicina + Ara-C desde el día 5 al 11 y una 2ª línea de rescate con Ara-C y amsacrina del día 41 al 45, no existiendo respuesta y pasando a pautarse tratamiento paliativo
- Recibe dosis total de corticoides de 100mgr y citarabina en perfusión.
- Neutropenia < 500/μl, 33 días, < 100/μl, 17 días
- Fiebre desde el día 13 al 39 y del día 41 al 67
- No itraconazol por escape de profilaxis
- Voriconazol como tratamiento de IFI por imagen de TAC y GM positivo y luego caspofungina asociada por empeoramiento del TAC
- TAC (día 5): Imagen nodular bien delimitada y TAC (día 33): nódulo de mayor tamaño
- En un lavado broncoalveolar del día 55 y en la biopsia transbronquial se objetivan hifas tabicadas en el examen directo compatible con *Aspergillus* spp
- *Exitus* el día 80 por enfermedad avanzada e insuficiencia respiratoria

Paciente 3



Paciente con LAM ingresa para tratamiento de inducción recibiendo tratamiento de rescate el día 41 sin haber respuesta y pautándose tratamiento paliativo. IFI probable desde el día 5. La PCR no se adelanta al GM y TACAR.

Paciente 4

LAM

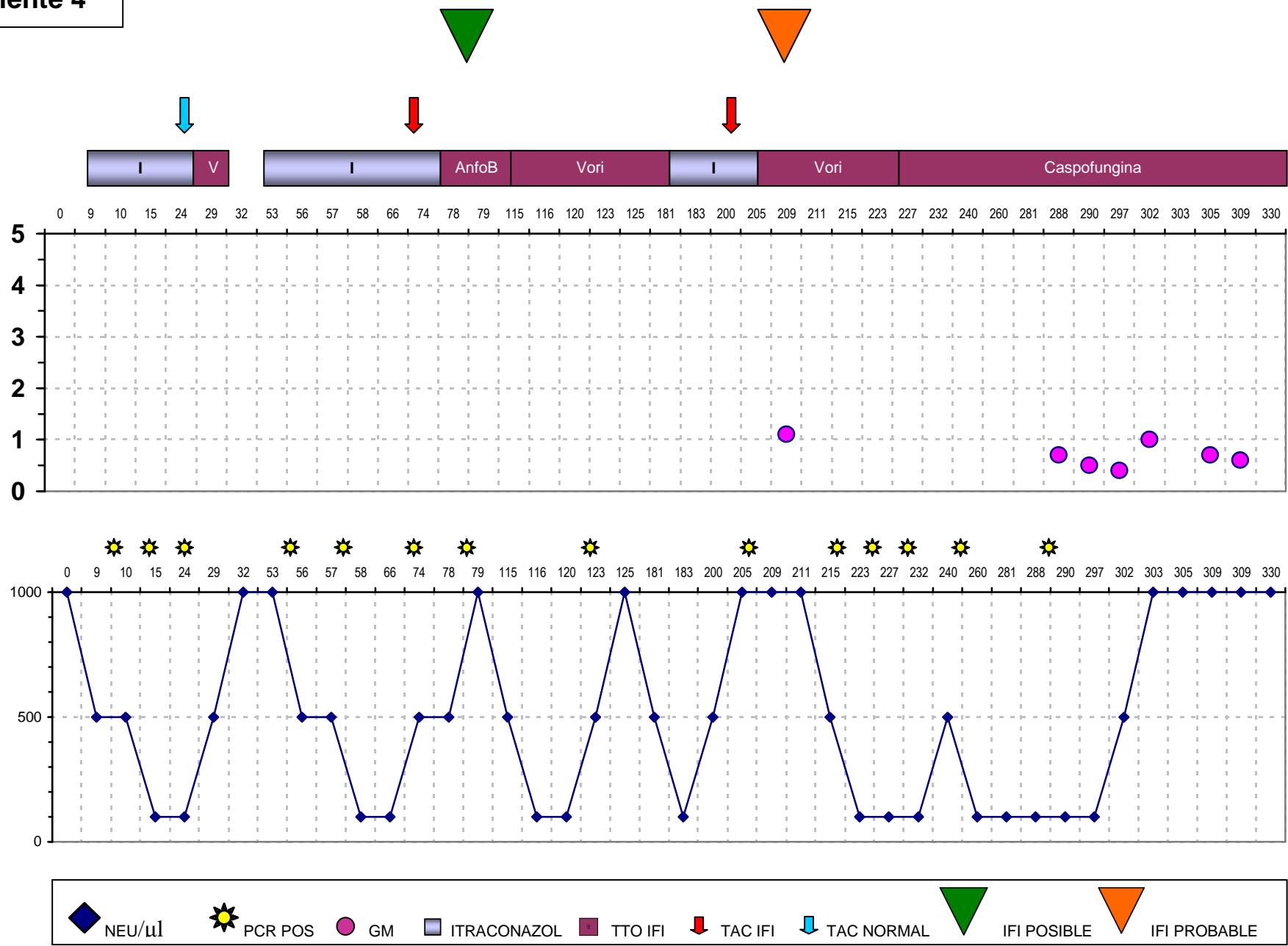
Mujer de 36 años

- Ingreso el día 0 para tratamiento de inducción desde el día 4 al 10 con idarrubicina + Ara-C
- Recibe una dosis total de corticoides de 180 mg y citarabina en perfusión
- Neutropenia < 500/ μ l, 21 días, < 100/ μ l, 14 días
- Fiebre desde el día 9 al 21
- Tazocel desde el día 22 al 27
- Se inició voriconazol por fiebre mantenida con TAC normal, aunque leve derrame pleural
- Ingreso de nuevo el día 44 para 2º ciclo de quimioterapia del día 48 al 54 quedando en remisión completa
- Dosis de corticoides total de 40 mg y citarabina en perfusión.
- Neutropenia < 500/ μ l, 22 días, < 100/ μ l, 15 días
- Neutropenia febril con fiebre del día 58 al 70
- Recibe anfotericina B por imagen en el TAC de nódulo con halo en lóbulo inferior izquierdo (día 71)
- Ingreso nuevamente el día 106 para tratamiento de consolidación del día 106 al 108
- Se realiza movilización y recolección de células progenitoras de sangre periférica, remisión completa citológica.
- Dosis total de corticoides 40 mgr y citarabina en perfusión
- Neutropenia < 500/ μ l, 9 días, < 100/ μ l, 6 días
- Fiebre del día 118 al 122
- Recibe voriconazol como profilaxis secundaria
- Ingreso el día 170 para tratamiento quimioterápico del día 171 al 175 por enfermedad residual y a la espera de TPH alogénico no emparentado

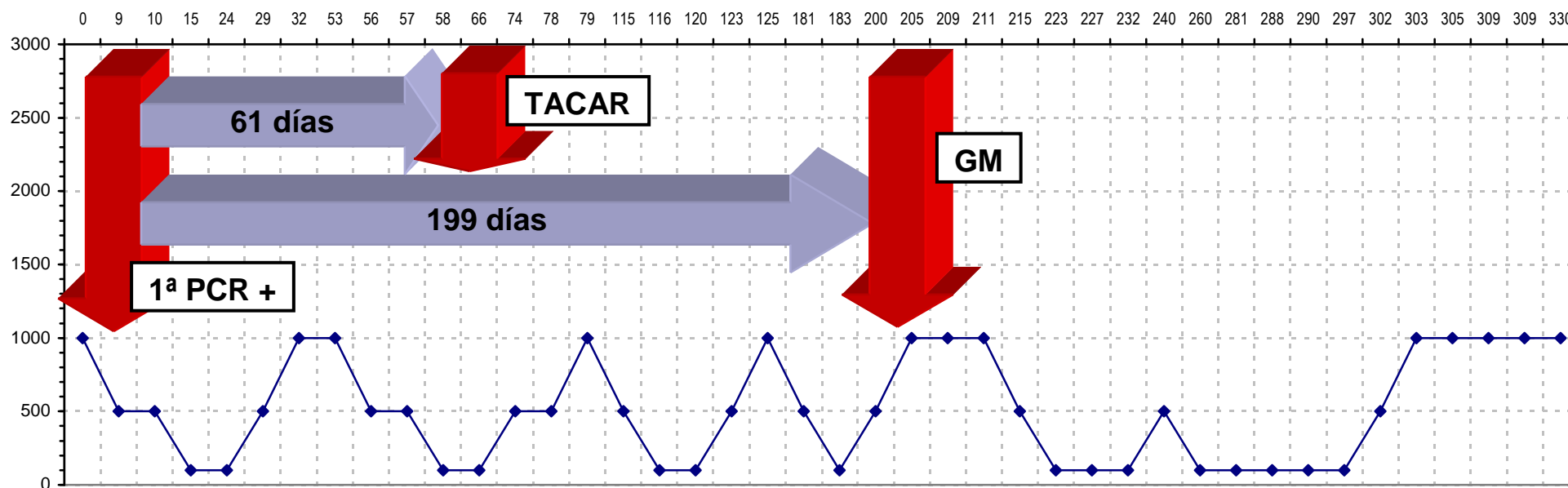
con 2ª línea de quimioterapia con mAMSA + Ara-C, ante refractariedad se administra 3ª línea el día 307 con FLAG-Ida (fludarabina, citarabina, idarrubicina) y 4ª línea del día 347 al 351 con AraC, mitoxantona y Mylotarg (gentuzumab, ozogamicin o anti-CD33)

- También recibe citabina en perfusión
- Neutropenia < 500/ μ l, 21 días, 33 y 28 respectivamente y <100/ μ l, 16, 16 y 18 días respectivamente
- Neutropenia febril con fiebre del día 190 al 203 y del día 222 al 224
- Imagen de nuevo TAC: nódulo residual (día 200) y nuevos micronódulos
- Se pauta voriconazol (estaba con itraconazol) por GM positivo y TAC IFI (día 209)
- Ingreso para nuevo ciclo de quimioterapia del día 278 al 280 con 5ª línea de quimioterapia: fludarabina + mefalan, timoglobulina, ciclosporina y metotrexate
- Dosis total de corticoides 1gr
- Neutropenia < 500/ μ l, 23 días y 51 < 100/ μ l, 23 días.
- Fiebre del día 268 al 284
- Se pautó caspofungina como tratamiento anticipado desde la 4ª línea
- Presentó también infección vírica por CMV con encefalitis y tratamiento con ganciclovir
- Último ingreso para Trasplante alogénico el día 289: síndrome de toxicidad epitelial postrasplante. Precisó hemodiálisis
- El día 322 el paciente presentó edema agudo de pulmón, precisando ingreso en unidad de cuidados intensivos
- *Exitus* el día 330

Paciente 4



Paciente 4



Paciente con LMA, tto de inducción y 2º ciclo de QT alcanzando RC. El día 71 diagnóstico (dto) de IFI posible (TACAR IFI) posteriormente enfermedad residual recibiendo hasta 5º línea de QT. IFI probable día 209 por GM + TACAR con lesiones residuales y nuevas de IFI, TPH alogénico posteriormente. *Exitus* día 330. PCR se adelanta 61 días al GM y 199 al TACAR.

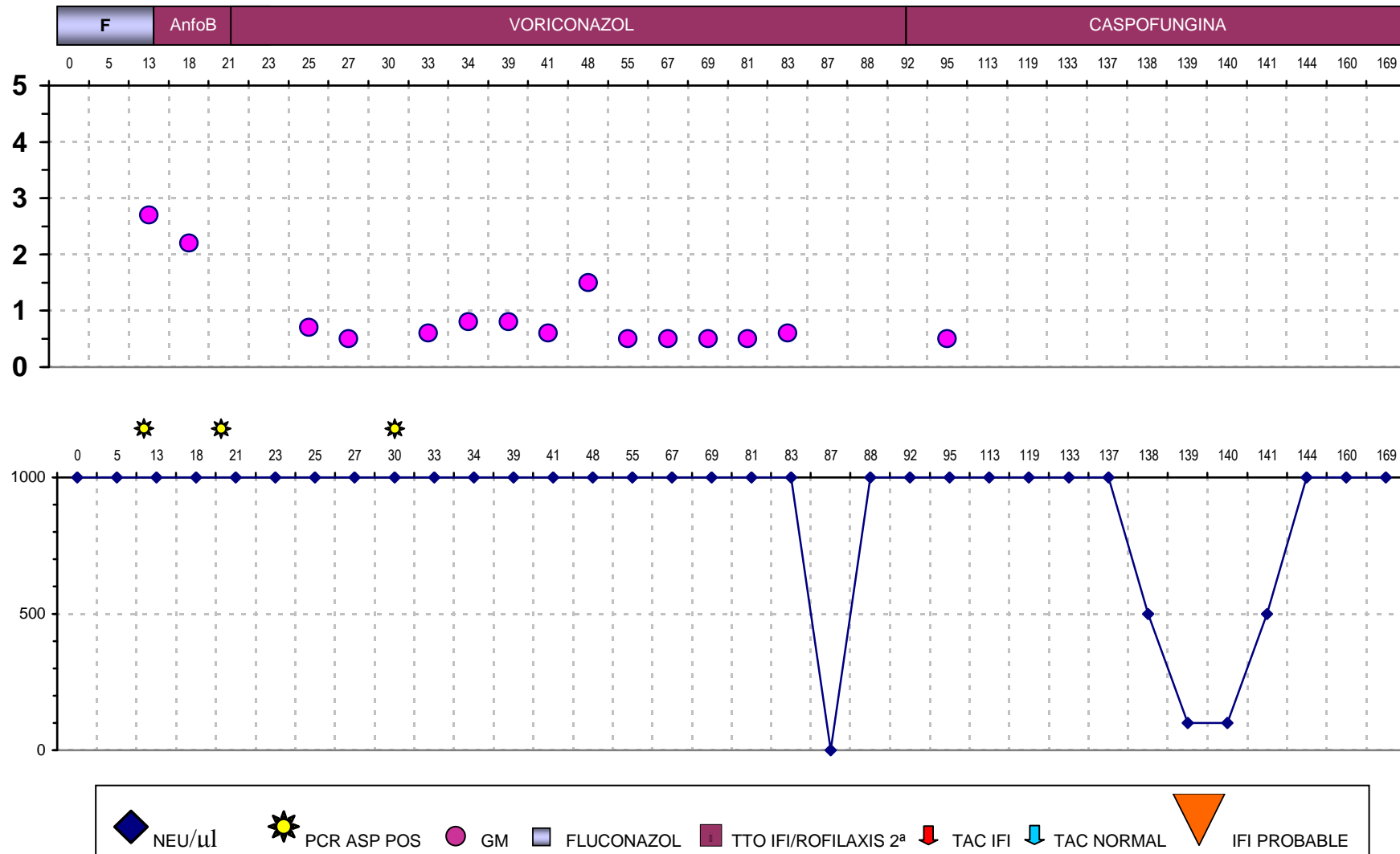
Paciente 5

Mieloma Múltiple (MM)

Mujer de 39 años

- Ingreso el día 0 de seguimiento por reagudización de EICH en paciente con mieloma múltiple multitratado: 6 ciclos de VBCMP-VBAD (vincristina, BCNU, ciclofosfamida, melfalan, prednisona/ vincristina, BCNU, adriamicina, dexametasona), dos TPH autólogos, posteriormente 3 ciclos de bortezomid y tres meses antes TPH alogénico no mieloablativo). EICH grado II, dos meses antes
- En tto con ciclosporina y corticoides
- El día 13 se diagnostica de IFI probable con dolor agudo localizado compatible con sinusitis y TAC compatible, recibiendo anfotericina B y posteriormente sustitución por voriconazol por hipopotasemia
- TAC: Sinusitis
- Nuevo ingreso día 33 por progresión de EICH
- Se inició tratamiento de 3ª línea con Inolimomab iv (leukotac ®) y sustitución de ciclosporina por tacrolimus, asociando posteriormente Rituximab
- Cambio de voriconazol a caspofungina por toxicidad
- *Exitus* el día 169 por EICH y múltiples complicaciones (sepsis por *Klebsiella*, infección por CMV, encefalopatía toxico metabólica., ascitis e íleo paralítico de etiología multifactorial)

Paciente 5



Paciente con Mieloma Múltiple que tras varios ciclos de QT y TPH alogénico no mieloablativo y estando en remisión parcial, presenta EICH. Dto IFI probable el día 13. PCR, GM y TAC positivos a igual tiempo y desde el inicio del tratamiento. *Exitus* el día 169 por EICH y múltiples complicaciones.

Paciente 6

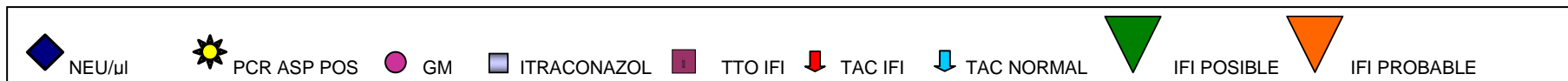
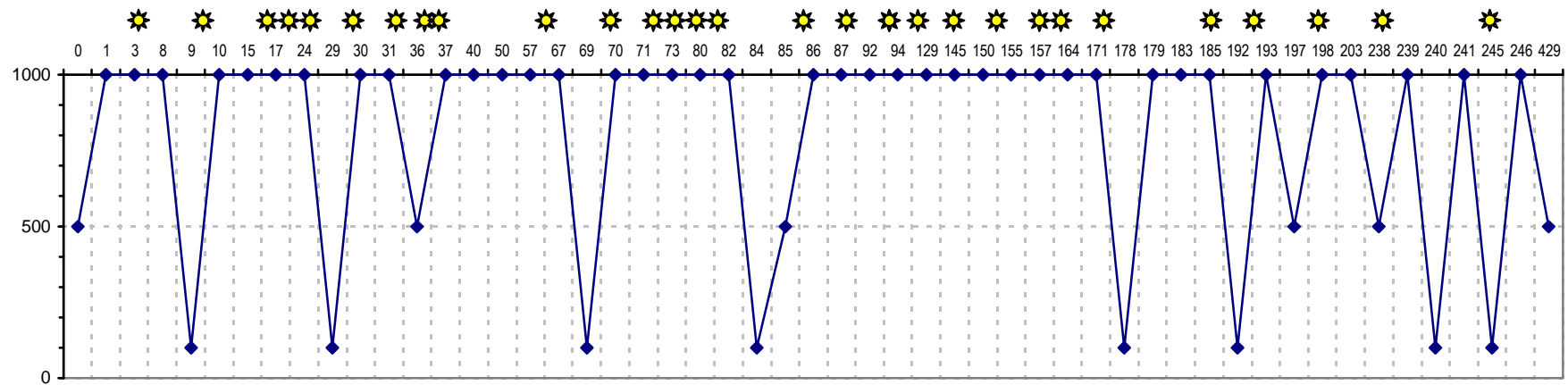
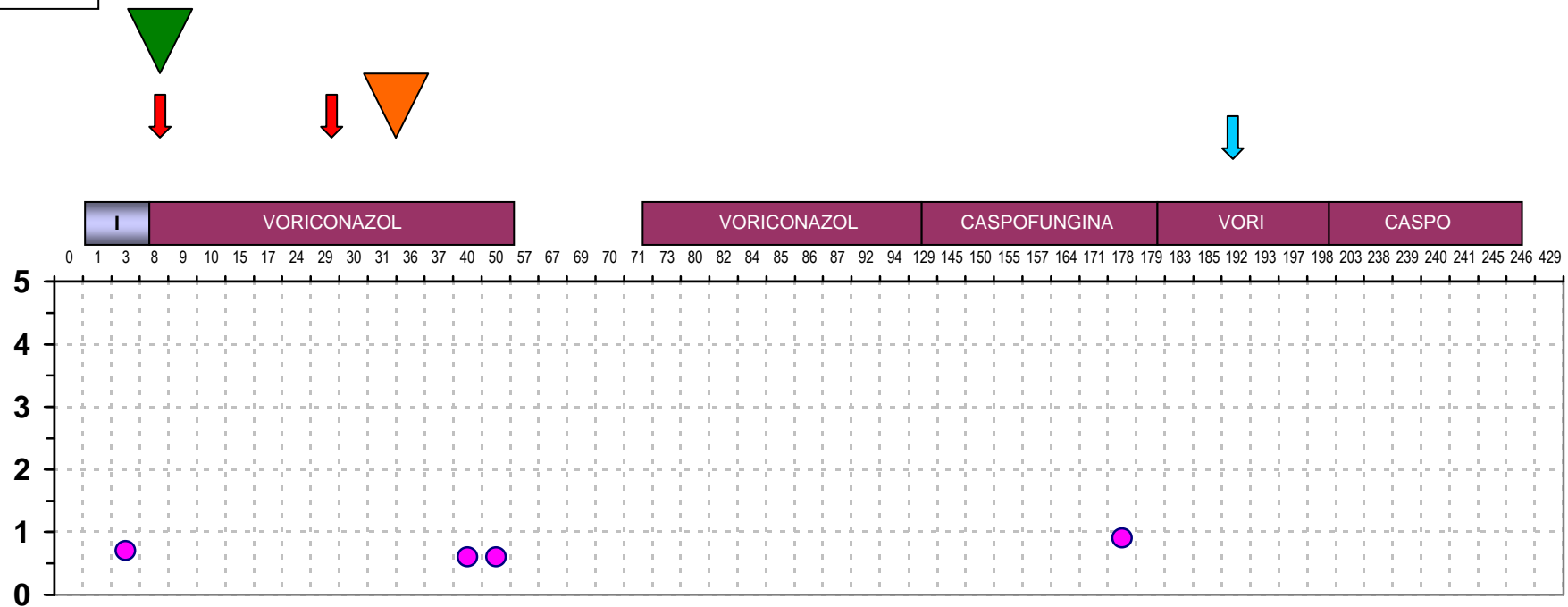
LAM

Varón de 57 años

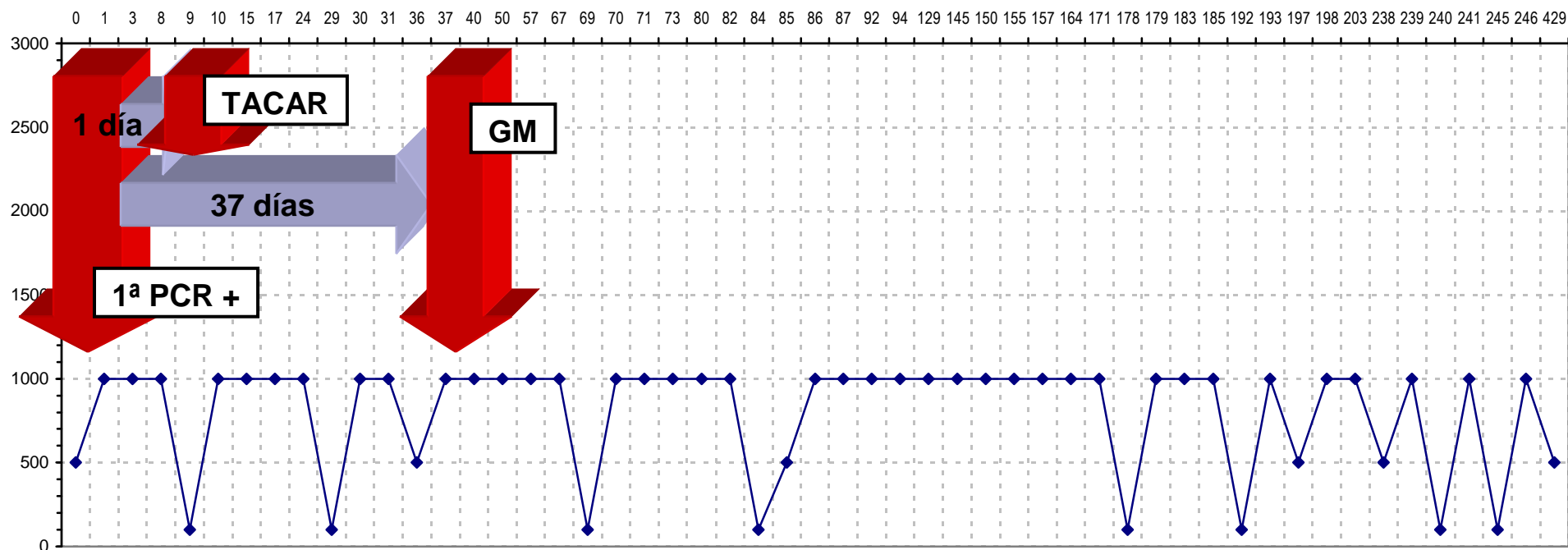
- Ingreso el día 0 para tratamiento de inducción ICE (idarrubicina, citarabina, etopósido) del día 3 al 10
- Recibe citarabina en perfusión
- Neutropenia < 500/ μ l, 42 días, < 100/ μ l, 20 días
- Fiebre del día 1 al 45, fiebre tumoral y enterocolitis neutropénica.
- Voriconazol por hiperbilirrubinemia con itraconazol y por imagen de TAC y GM positivo (IFI probable)
- Imagen del TAC: derrame izquierdo con imagen nodular lóbulo inferior derecho
- Vuelve a ingresar el día 55 para tratamiento de rescate del día 60 al 68 por refractariedad-progresión
- Recibe citarabina en perfusión + amsacrina
- Neutropenia < 500/ μ l, 16 días, < 100/ μ l, 15 días
- Fiebre del día 69 al 83, fiebre trombótica
- Se mantuvo tratamiento con voriconazol por GM positivo
- Nuevo ingreso para tratamiento de consolidación del día 171 al 175, quedando el paciente en remisión completa
- Recibe citarabina en perfusión de nuevo
- Neutropenia < 500/ μ l, 19 días, < 100/ μ l, 14 días
- Fiebre del día 179 al 181
- Tratamiento con caspofungina y posterior cambio a voriconazol por elevación de transaminasas, posteriormente se objetivó como causa de la hipertransaminasemia una serología VHC + como nuevo diagnóstico
- Ingreso día 227 para trasplante alogénico
- Recibe fludarabina y ciclosporina
- Neutropenia < 500/ μ l, 9 días, < 100/ μ l, 5 días

- Fiebre del día 240 al 242
- El paciente fuera del seguimiento tras el trasplante presentó una recidiva con nuevo ciclo de quimioterapia, ingresando el día 429 por neutropenia febril, GM positivos y TAC compatible con IFI: múltiples imágenes nodulares acompañadas de imágenes en vidrio deslustrado en lóbulo medio derecho, se trató con voriconazol asumiendo IFI y falleció posteriormente por pancitopenia no relacionado con IFI

Paciente 6



Paciente 6



Paciente con LMA que ingresa para tto de inducción, presentando el día 40 IFI probable, posteriormente tto de rescate por progresión de enfermedad de base alcanzando RC. El paciente posteriormente recibe TPH alogénico y fuera del seguimiento nueva IFI probable en fase de recidiva. Posteriormente *exitus* por recidiva-refractoriedad de enfermedad de base y pancitopenia. PCR se adelanta 1 día al TACAR y 37 días al GM.

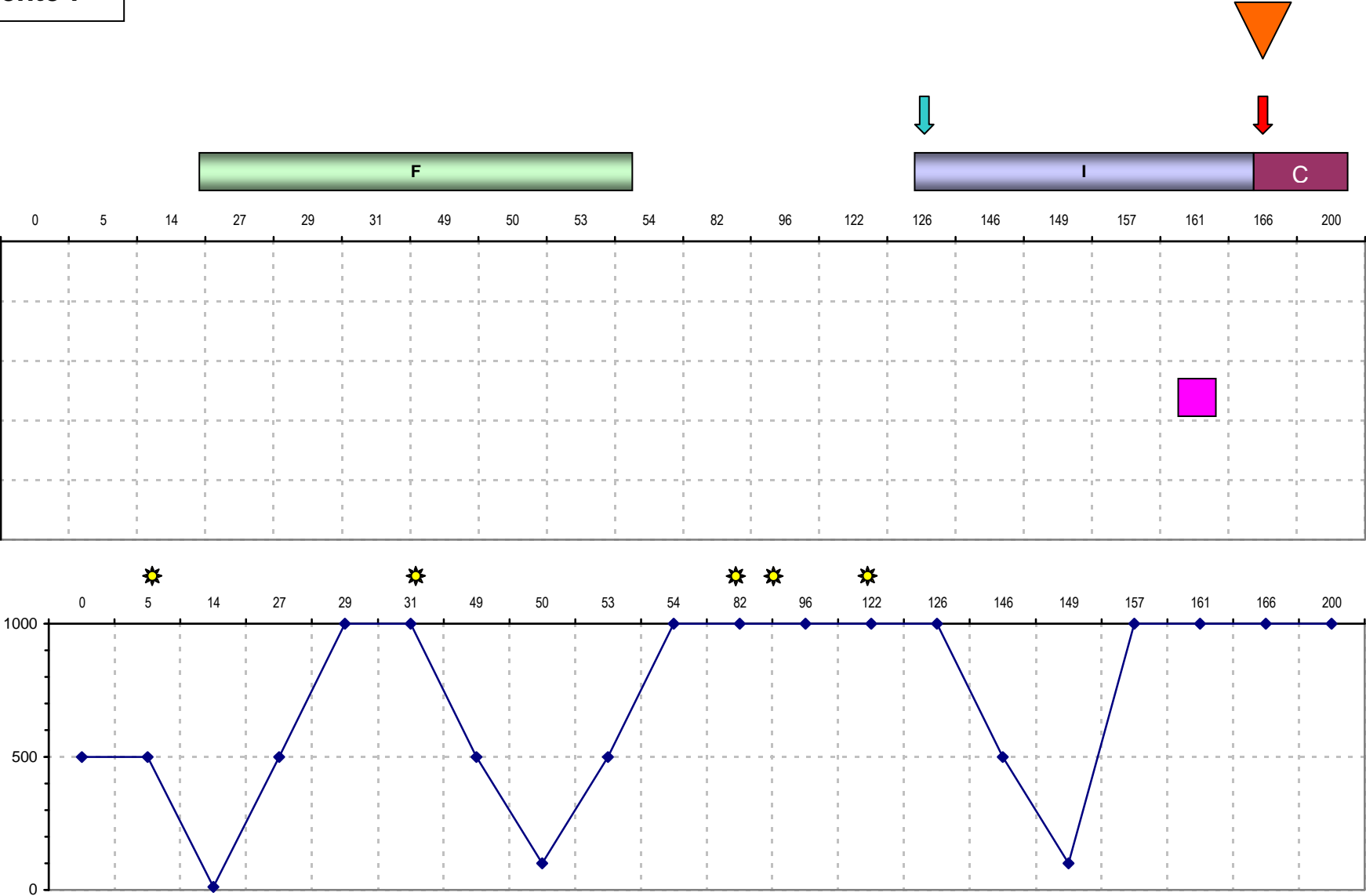
Paciente 7

LAL

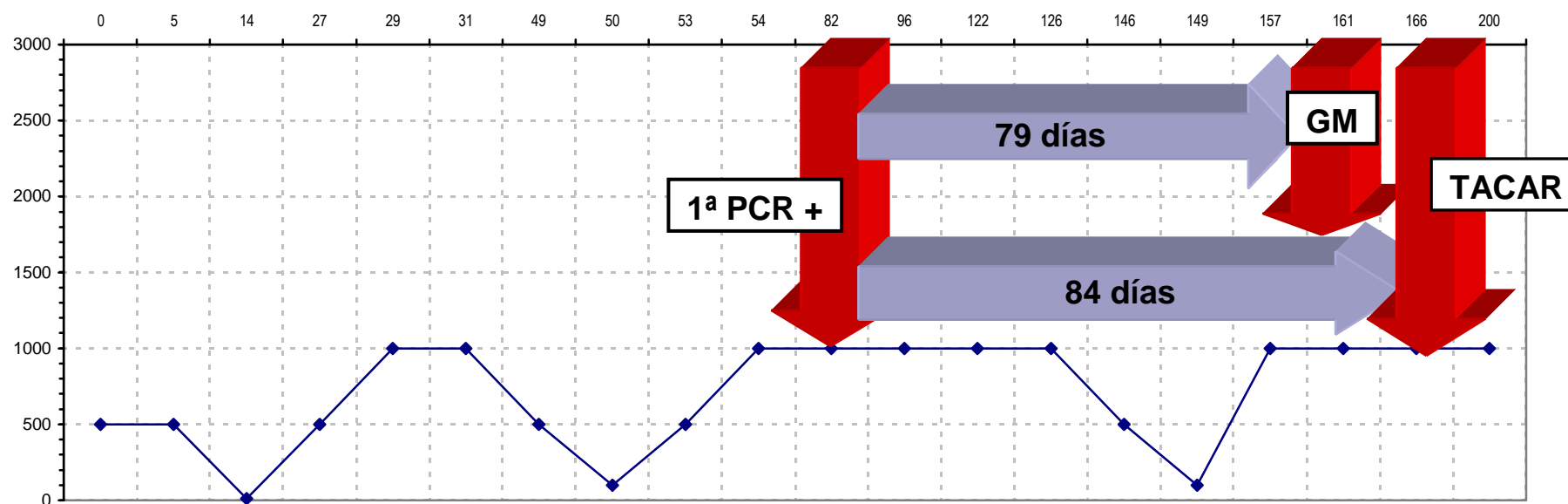
Varón de 47 años

- Ingresa el día 0 por recidiva leucémica para tratamiento de reinducción con una 2ª línea de HiperCVAD (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona/ metotrexato, Ara-C), (el tratamiento de mantenimiento había finalizado 7 meses antes confirmándose el estado de remisión completa, el paciente había recibido tto según protocolo PETHEMA de alto riesgo para el adulto y TPH autólogo)
- El paciente recibe varios ciclos de quimioterapia del día 10 al 20, día 39 al 42 y del día 68 al 77
- Recibió dosis total de corticoides 1 gr
- Neutropenia < 500/ μ l, 28 días, y < 100/ μ l, 12 días y posteriormente en el segundo ciclo < 500/ μ l, 5 días y < 100/ μ l, 2 días
- Neutropenias febriles del día 0 al 2 y del día 50 al 54, resueltas con tratamiento antibiótico
- Ingreso de nuevo el día 68 para nuevo ciclo de quimioterapia con Hiper-CVAD+ Rituximab partiendo de una médula ósea en remisión citológica completa, posteriormente se observa refractariedad con necrosis masiva medular
- Como protocolo de rescate recibe vincristina-antraciclinas semanales con pulsos de L-asparaginasa y corticoides continuos, intercalando, según tolerancia, pulsos de ARA-C y VP16 (día 136 al 143)
- Recibe corticoides 430 mgr y citarabina 1500-2000mg
- Neutropenia < 500/ μ l, 11 días y < 100/ μ l, 8 días
- Neutropenia febril del día 149 al 163
- Caspofungina por cultivo *Aspergillus* en esputo y TAC compatible con IFI
- Imagen del TAC: nódulo con signo del halo
- *Exitus* día 200 por leucemia refractaria

Paciente 7



Paciente 7



Paciente con LAL que presenta refractariedad tras haber quedado en RC posteriormente a tto de reinducción por recidiva de enfermedad de base. Presenta el día 166 IFI probable, posteriormente *exitus* por progresión de enfermedad de base. PCR se adelanta 79 días al GM y 84 días al TACAR.

Paciente 8

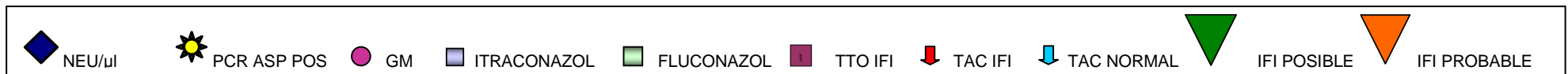
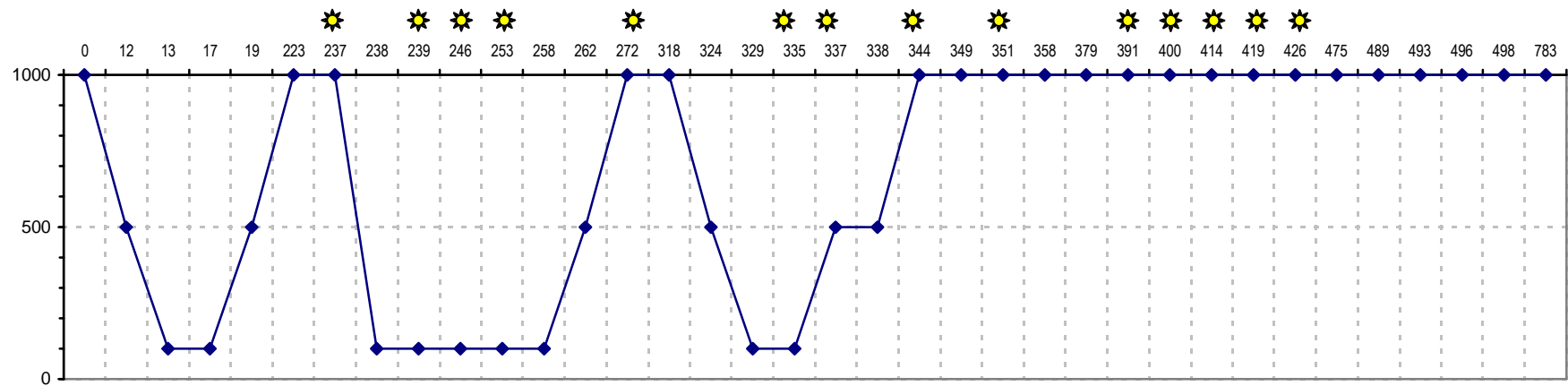
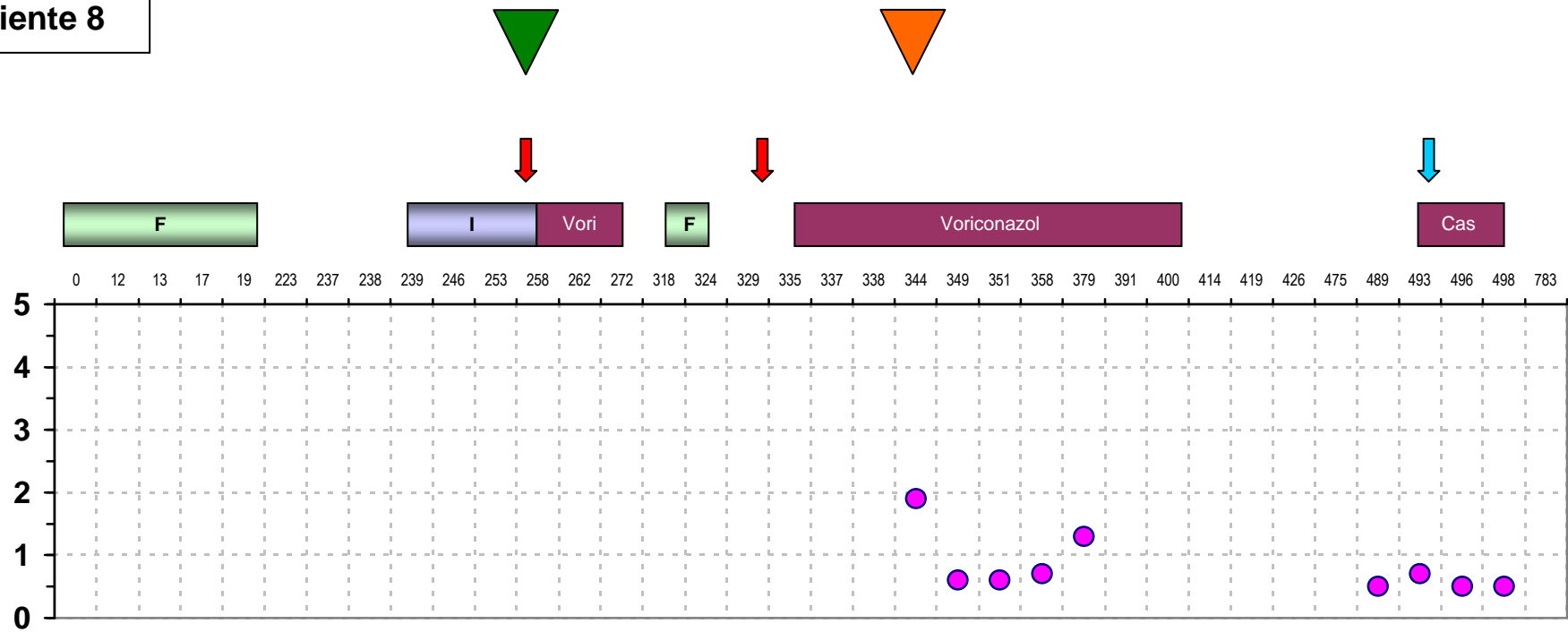
LAM

Mujer 42 años

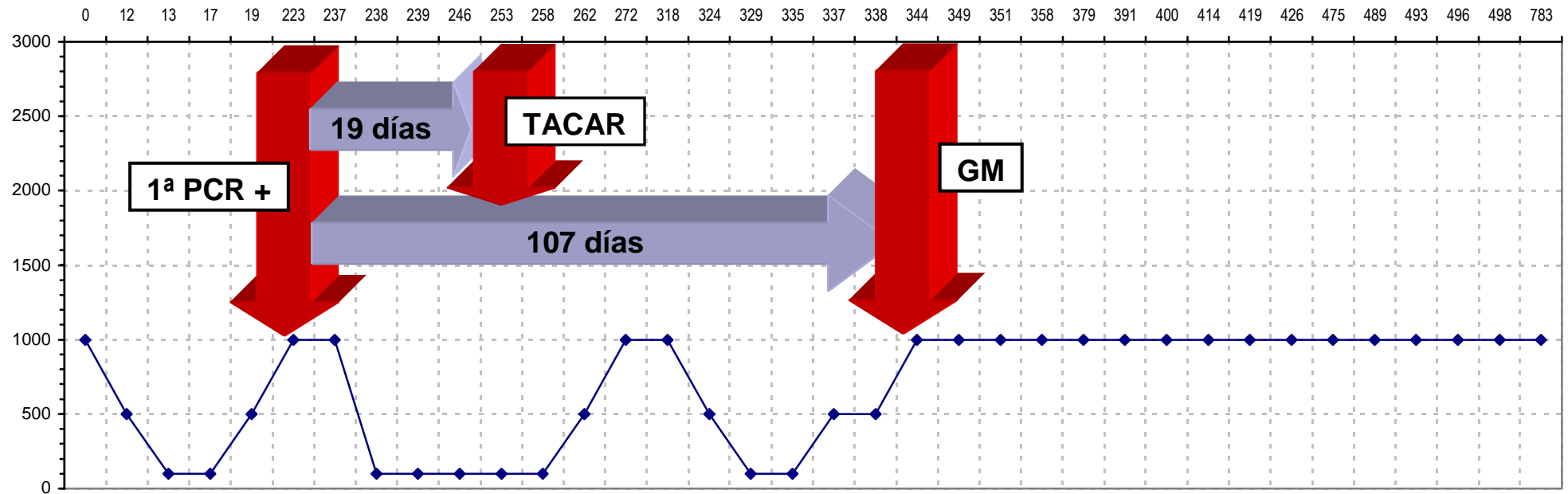
- Ingreso día 0 había obtenido RC con un esquema de poliquimioterapia tipo 3/7 con citarabina y daunorrubicina, posteriormente recibió un 2º ciclo de inducción similar al primero y un 2º de consolidación con idarrubicina y citarabina
- Ahora ingresa para acondicionamiento con Bucy-2 (busulfán, ciclofosfamida) + TPH autólogo (TASPE)
- Recibe una dosis total de corticoides de 125mg
- Neutropenia < 500/ μ l, 7 días, < 100/ μ l, 4 días
- Neutropenia febril resuelta con tratamiento antibiótico profiláctico
- Ingreso nuevamente el día 223 por recidiva a los 7 meses de TASPE
- Se inicia tratamiento de rescate con amsacrina + citarabina en perfusión del día 234 a 340
- Neutropenia < 500/ μ l, 24 días, < 100/ μ l, 20 días
- Presentó fiebre del día 246 al 258
- Se inició voriconazol por imagen del TAC: nódulos pulmonares (IFI posible) (día 246)
- Ingreso el día 318 estando en remisión completa para trasplante alogénico
- Dosis total de corticoides 70mg, ciclosporina, 300mg
- Recibe también fludarabina + mefalan para acondicionamiento no ablativo (día 318 a 322)
- Neutropenia < 500/ μ l, 14 días y < 100/ μ l 6 días.
- Fiebre del día 355 al 339
- Esofagitis ulcerosa grave por CMV
- Se inició caspofungina por GM positivo día 344 (micronódulos y derrame pleural en TAC)

- Ingreso el día 475 en remisión completa, ingresa por enfermedad injerto contra huésped crónica oral y hepática con respuesta a esteroides y micofenolato
- NOTA: La paciente posteriormente al seguimiento presentó varios ingresos por neutropenia febril, infección por CMV e infecciones respiratorias con Rx normal
- Finalmente recidiva leucémica meníngea. Coma irreversible
- *Exitus* día 783

Paciente 8



Paciente 8



Paciente con LAL que presenta recidiva de enfermedad de base tras TPH autólogo, apareciendo en ese momento TAC IFI, posteriormente estando en RC y tras TPH alogénico, dto de IFI probable el día 344. Finalmente *exitus* por recidiva enfermedad base. PCR se adelanta 19 días al TACAR y 107 días al GM.

Paciente 9

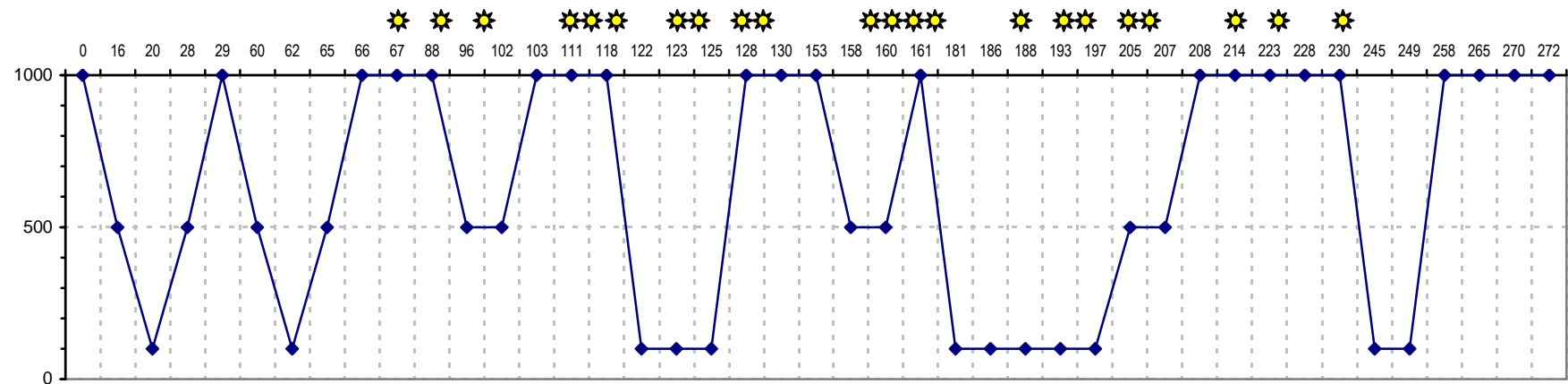
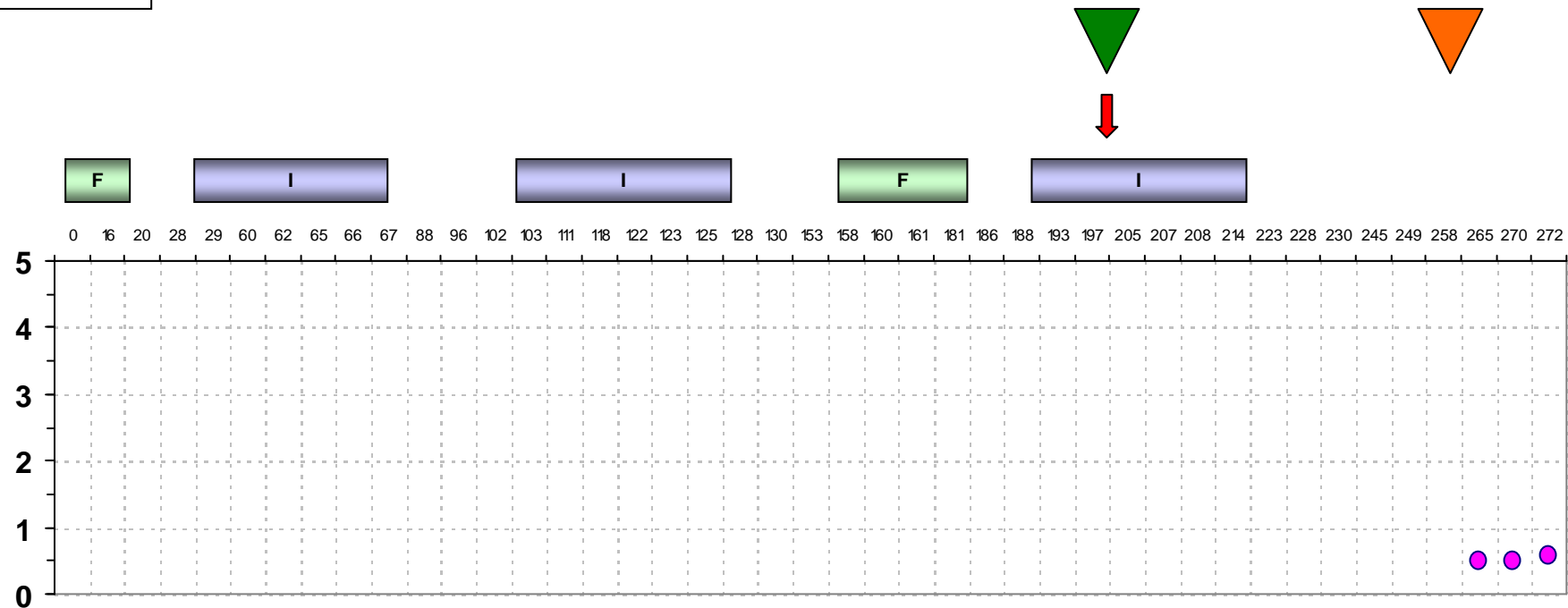
LAL

Varón de 32 años

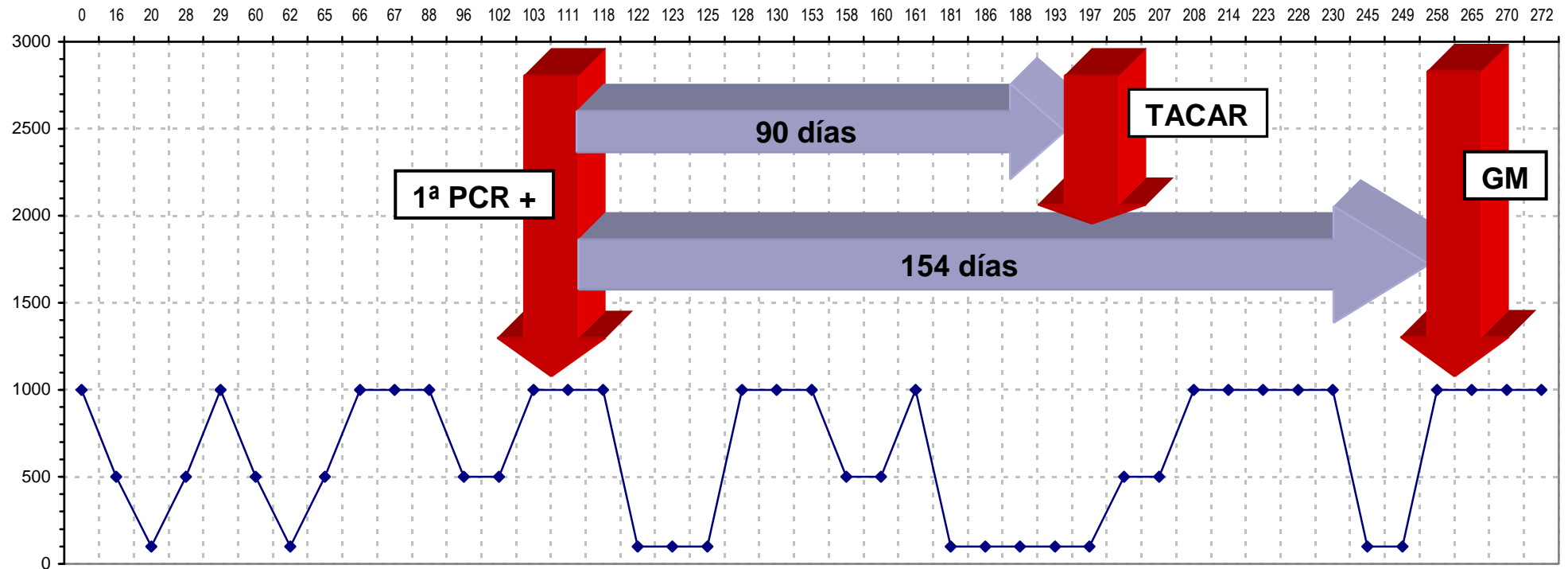
- Ingresa el día 0 para tratamiento de inducción según protocolo PETHEMA de alto riesgo para el adulto del día 1 al día 22 alcanzando la remisión completa
- Recibe dosis total de corticoides de 3720 mgr
- Neutropenia < 500/ μ l, 15 días y < 100/ μ l, 10 días
- Ingresa de nuevo el día 40 para tratamiento de consolidación, 1º bloque del día 48 al día 53 y 2º bloque del día 80 al día 89.
- Recibe citarabina > 2gr
- Neutropenia < 500/ μ l, 5 días y < 100/ μ l, 2 días y en el segundo bloque, neutropenia < 500/ μ l, 6 días
- Fiebre del día 61 a 68 con respuesta a antibioterapia
- Ingreso el día 110 para tratamiento de consolidación (3º bloque) del día 113 al día 117
- Recibe citarabina > 2gr
- Neutropenia < 100/ μ l, 5 días
- Neutropenia febril del día 123 a 126
- Ingreso el día 113 para tratamiento de consolidación (4º bloque) del día 113 al 117
- Citarabina > 2gr
- Neutropenia < 500/ μ l, 2 días
- Fiebre en relación con proceso trombótico del día 153 al 155
- TAC No hecho
- Ingresa el día 181 por recidiva intratratamiento

- Tratamiento de rescate con 2ª línea de Ara-C + idarrubicina y 3ª línea de HiperCVAD, además de citarabina >2 gr. (del día 181 a 186 y del día 215 al 225).
- Neutropenia < 500/ μ l, 26 días, < 100/ μ l, 23 días
- Fiebre tumoral del día 197 al 203
- TAC: Infiltrado nodular inespecífico (día 201, IFI posible)
- Ingreso día 252 para tratamiento paliativo el día 243 con vindesina, VP16 (4ª línea)
- Neutropenia < 100/ μ l, 12 días.
- Fiebre tumoral del día 252 a 255
- No hecho TAC ni PCR
- Ingreso día 264, se había administrado tratamiento paliativo día 260 con vindesina + idarrubicina, 5ª línea
- Neutropenia < 500/ μ l, 17 días al < 100/ μ l, 17 días.
- Fiebre tumoral del día 264 al 270
- El paciente presenta progresión leucémica y probable hemorragia cerebral.
- *Exitus* día 276

Paciente 9



Paciente 9



Paciente con LAL que tras 4º bloque de consolidación, presenta recidiva de enfermedad de base por lo que inicia 2º y 3º línea de QT objetivándose IFI posible (TACAR compatible) positivándose posteriormente el GM (IFI probable). *Exitus* posterior por progresión enfermedad hematológica. PCR se adelanta 90 días al TACAR y 154 días al GM.

Paciente 10

LAM

Mujer de 26 años

PCR negativa. Falso negativo

- Recibe tratamiento de inducción día 0 según esquema 3 + 7: idarrubicina + Ara-C
- Profilaxis con itraconazol
- Dosis total de corticoesteroides, 1g
- Neutropenia < 500/ μ l, de 29 días y < 100/ μ l, 24 días.
- Neutropenia febril persistente
- CT Tórax: Infiltrado nodular (día 30)
- GM día 34 positivo 0,8 y el del día 40 de 0,5 (IFI probable)
- Tratamiento con voriconazol

- Ingreso el día 68 en RC para segundo ciclo de quimioterapia
- Neutropenia < 500/ μ l, 33 días y <100/ μ l, 27 días
- GM todos negativos. No hecho TAC.
- Ingreso 4 meses después para trasplante alogénico, posteriormente en remisión completa y sin complicaciones

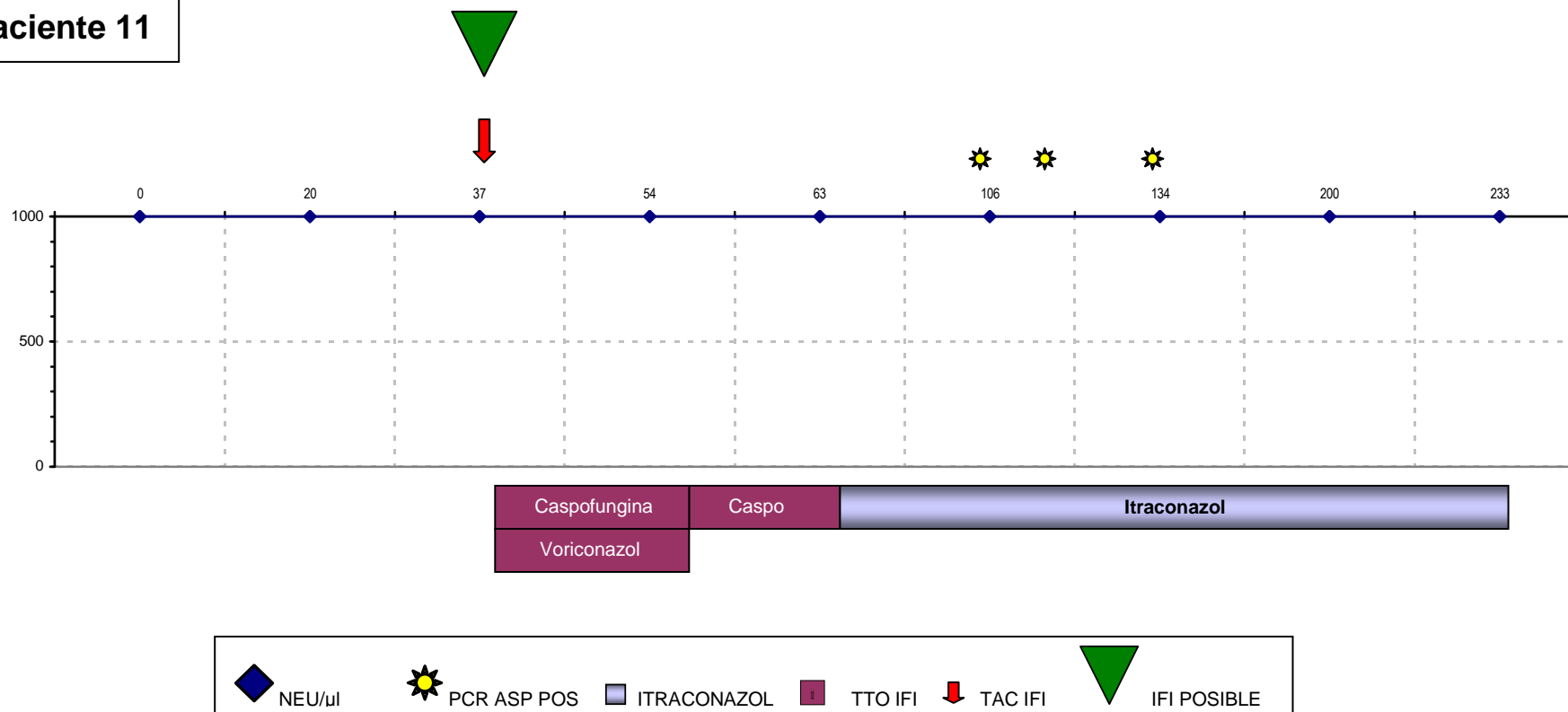
Paciente 11

Síndrome Mielodisplásico (SMD)

Varón de 64 años

- Ingreso el día 0 por SMD y por inicio de fiebre
- No tratamiento quimioterápico
- No neutropenia como tal por estar en tratamiento con G-CSF para mantener cifras por encima de 500 neutrófilos/ μ l
- Fiebre desde el 0 hasta el día 58.
- Desde el inicio tratamiento de forma empírica con voriconazol y caspofungina y posteriormente caspofungina con lo que se mantuvo afebril.
- Imagen del TAC del día 37: nódulos bilaterales y consolidación nodular en lóbulo superior derecho. No se hizo PCR, GM negativo
- Nuevo ingreso el día 77 por fiebre de nuevo
- Tto profiláctico secundario con itraconazol
- Reagudización de EPOC buena evolución en tto con meropenem (Rx tórax: cambios de enfisema pulmonar)
- PCR negativa, GM negativo
- Ingreso el día 102 por sepsis secundaria a colitis por *C. difficile*.
- GM negativo y TAC no hecho
- PCR positiva el día 106 y el día 134, posteriormente negativas
- Ingresa nuevamente el día 174 por infección respiratoria (Rx tórax: cambios de enfisema pulmonar), buena respuesta a tratamiento con cefepime
- Último ingreso el día 229 con desarrollo de LMA secundaria a SMD y el diagnóstico de bronconeumonía e insuficiencia respiratoria
- *Exitus* día 233

Paciente 11



Paciente con SMD que no inicia tto quimioterapia por fiebre desde inicio de dto, con TAC compatible con IFI el día 37 (IFI posible) con GM negativo y PCR no hecha en ese momento (luego negativas) y que posteriormente presenta varios ingresos por fiebre la mayoría en relación con infección respiratoria sin nuevos TACAR y con PCR posteriormente positivas. Se adelanta el TACAR a la PCR en 69 días. *Exitus* el día 233 con LMA tras SMD e Insuficiencia Respiratoria.

Paciente 12

LAM

Varón de 45 años

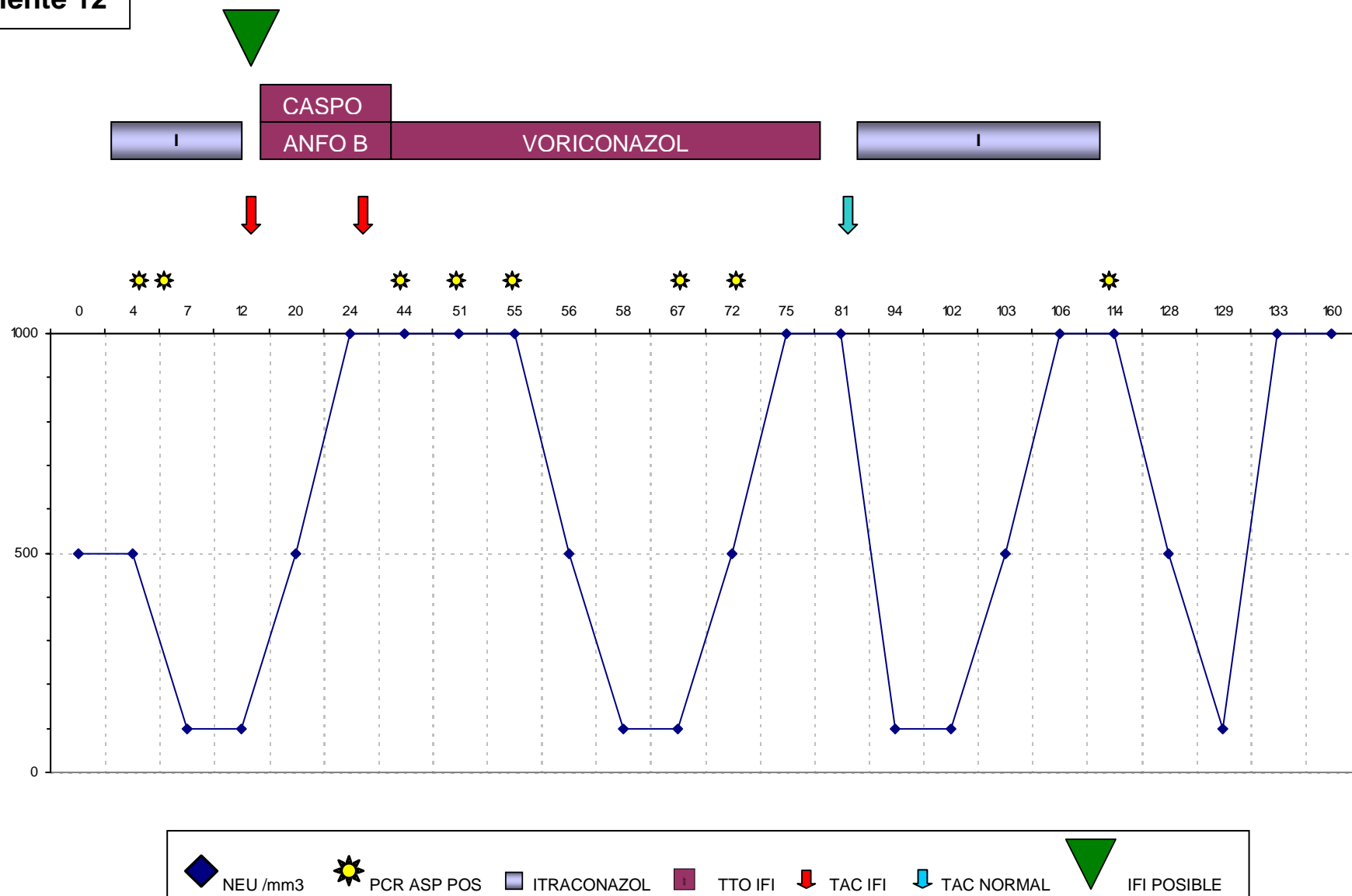
- Ingreso el día 0 para tratamiento de inducción con citarabina + Idarrubicina del día 0 al 8
 - Recibe dosis total de corticoides 1000 mgr y citarabina en perfusión
 - Neutropenia < 500/ μ l, 23 días, < 100/ μ l, 13 días
 - Fiebre del día 8 al 28
 - Anfotericina B y caspofungina por imagen de TAC, posteriormente voriconazol como profilaxis secundaria (GM en todo momento negativos)
 - TAC: Nódulo con halo sugestivo de IFI
-
- Ingreso día 44 en remisión completa para tratamiento de consolidación del día 47 al 53
 - Citarabina >2000 mgr.
 - Neutropenia < 500/ μ l, 18 días, < 100/ μ l, 13 días.
 - Fiebre del día 65 al 96
-
- Ingreso día 80 para tratamiento de intensificación con 2ª Ara-C día 82 al 88 con recolección de progenitores el día 123
 - Citarabina > 2000 mgr
 - Neutropenia < 500/ μ l, 15 días, < 100/ μ l, 11 días
 - Fiebre del día 94 al 96
-
- El día 160 se realizó trasplante autólogo sin complicaciones, posteriormente el paciente se ha mantenido en remisión completa.

Falsos positivos:

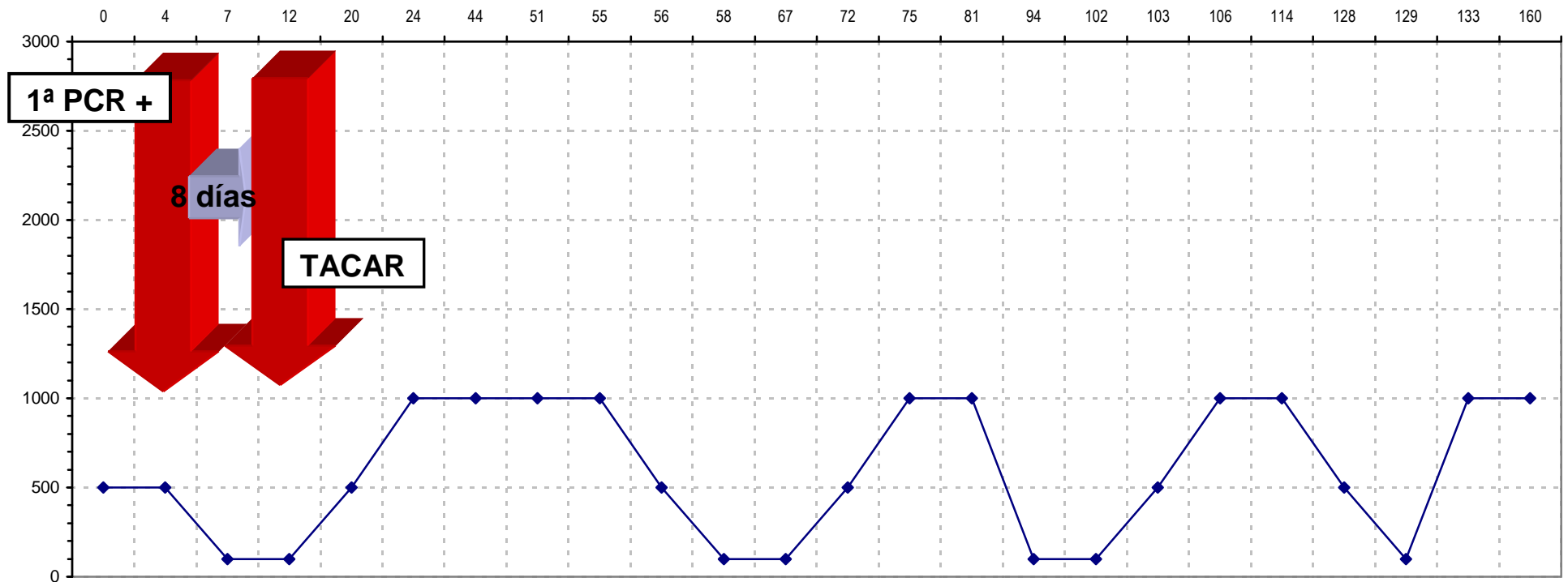
Los 4 pacientes con PCR positiva y sin diagnóstico de IFI son:

- Una paciente mujer con MM, GM repetidamente positivos y TAC normal. Falleció posteriormente por progresión de enfermedad de base
- Una paciente mujer con LAL, con GM repetidamente positivos, TAC normal, *exitus* por fracaso hepático (había recibido previamente al diagnóstico de la enfermedad hematológica, un trasplante hepático)
- Una paciente mujer con LNH, GM negativo y TAC no hecho
- Un paciente varón con LAM con trasplante alogénico no mieloablativo, con GM negativo y TAC no hecho

Paciente 12



Paciente 12



Paciente con LMA que tras tratamiento de inducción presenta IFI posible por imagen de TACAR, en todo momento GM negativos, posteriormente el paciente recibe tto de consolidación, intensificación y TPH autólogo alcanzando RC y sin complicaciones posteriores. PCR se adelanta 8 días al TACAR. PCR posteriores al día 114 negativas.

Resultados de la técnica de PCR

La tabla XI muestra los resultados de la técnica de PCR. El análisis se realizó con un resultado positivo, con dos o más resultados consecutivos positivos y con tres o más resultados positivos. Tanto con uno como con dos resultados positivos, la técnica de PCR detectó 11 de los 12 casos de aspergilosis (91.6%). Con dos resultados positivos de PCR, la S fue del 91%, con una E del 94%, un VPP del 73% y un VPN del 98%.

De los 83 pacientes en riesgo de aspergilosis, 18 pacientes tenían al menos 2 GM positivos mayores de 0,5 o uno por encima de 0,8. De estos 18 pacientes, verdaderos positivos fueron 9 (1IFI probada y 8 IFI probables).

Al comparar los resultados de la técnica PCR-TR con dos PCR positivas con la técnica de GM (ELISA platelia), los resultados de la determinación de GM para el diagnóstico de IFI presentaron porcentajes menores en comparación a la PCR, con una S del 75%, E del 87,3%, VPP del 50% y un VPN del 95%.

Con dos resultados positivos de PCR se obtuvieron cuatro falsos positivos, pero con un solo resultado positivo se observaron 14 falsos positivos, lo que daba un PPV del 43.9%. Un dato interesante a tomar en consideración es que dos de los cuatro falsos positivos con dos resultados de PCR positivos tenían también GM positivo. Estos dos enfermos presentaban un MM y una LAL como enfermedades de base y no mostraban ningún síntoma ni signo clínico compatible con infección fúngica invasiva, por lo que fueron considerados como falsos positivos.

El análisis con tres o más resultados positivos mostró un descenso de la sensibilidad ya que sólo se detectó un 75% de los casos. Con tres resultados positivos el número de falsos positivos se redujo a dos. Uno de estos casos era uno de los dos enfermos con GM positivo comentados en el párrafo anterior.

Debe destacarse que todas las muestras analizadas del enfermo con candidiasis y del enfermo con zigomicosis fueron negativas por la técnica de PCR-TR de *Aspergillus*.

El estudio de correlación entre la cuantificación de DNA y la clínica de los enfermos no encontró relaciones significativas entre el *Ct* y la aparición de signos de aspergilosis invasiva. Es decir, no se encontró ningún *cut-off* que permitiera diagnosticar la infección con mayor fiabilidad o distinguir entre falsos positivos y verdaderos positivos. Todos los pacientes con PCR positiva presentaron valores de *Ct* entre 35-40 ciclos.

Al analizar los resultados por muestra recibida, sangre o suero, no se encontraron diferencias significativas, y ambas muestras mostraron tener rentabilidad diagnóstica similar.

Análisis CART

Para conocer la capacidad predictiva de la técnica de PCR con uno, ≥ 2 y ≥ 3 resultados positivos, se realizó un análisis CART en el que se incluyeron además las variables clínicas y microbiológicas más relevantes.

Para evaluar la probabilidad diagnóstica de la técnica de PCR, se generaron curvas ROC en las que se representaron los verdaderos positivos y los falsos positivos, calculándose el área bajo la curva (AUC) de cada curva ROC.

En la Tabla XII se observan las AUCs y los intervalos de confianza (95% CI) para cada uno de los criterios diagnósticos. Tanto con un resultado positivo por PCR como con dos, con tres y con la técnica de GM, las curvas ROC mostraron muy buenos resultados, con AUC próximas a 1 y estadísticamente significativas. Los mejores resultados se obtuvieron con la técnica de PCR con dos o más resultados positivos, con un AUC de 0.930 (95% CI=0.834-1.026, $P<0.01$).

Tras la obtención de las curvas ROC, se realizó un análisis *data mining* con el programa CART. En este análisis la variable que predijo con mayor probabilidad la presencia de aspergilosis invasora fue la técnica diagnóstica de PCR cuando se utilizaba como criterio diagnóstico dos o más resultados positivos en menos de una semana. Con este criterio, el riesgo relativo de aspergilosis se incrementó 5.04 veces y el éxito predictivo del algoritmo generado se cifró en el 93.98%. Los riesgos relativos y éxito predictivo de los otros tres criterios (uno y tres resultados positivos por PCR y el GM) fueron también elevados aunque inferiores a los encontrados con dos resultados positivos.

También se realizó un análisis CART, intentando descubrir que combinación de pruebas diagnósticas podría ser la más eficaz para la detección de la aspergilosis. En la Figura 1 se muestra el algoritmo que mejor predice la presencia de aspergilosis en los pacientes incluidos en el estudio. Este algoritmo presentó un área bajo la curva de 0.97 (95% CI 0.895-1.032, $P<0.01$), con un riesgo relativo de aspergilosis 6.92 veces superior que la población control y con un éxito predictivo del 95.2%. La combinación de dos resultados positivos por la técnica de PCR más la cuantificación de GM detectó el 100% de los casos de aspergilosis, con un PPV del 75.1%.

Análisis de la precocidad diagnóstica

Un dato relevante es el de la precocidad diagnóstica. En la tabla X se incluyen los resultados de la PCR tomando en cuenta dos o más resultados positivos únicamente. Este análisis no pudo realizarse en el paciente 10, ya que el resultado de la PCR fue negativo. En los otros 11 enfermos, sí pudo calcularse la precocidad diagnóstica de la técnica de PCR respecto al TACAR. En dos enfermos, la detección de ADN fúngico se produjo al mismo tiempo que la observación de las imágenes patológicas en el TACAR. En otros dos casos el TACAR detectó la infección antes que la técnica de PCR. En los siete restantes, la detección de ADN fúngico precedió al TAC, con una media de adelanto diagnóstico de 24 días (1-84 días).

En el caso del GM, el estudio de precocidad diagnóstica pudo realizarse en nueve enfermos (tabla X). En dos enfermos, la detección de ADN fúngico y de GM se produjo al mismo tiempo. Estos dos casos son los mismos en los que también se detectaron coetáneamente las imágenes patológicas en el TACAR. En un caso, la cuantificación de GM precedió a la detección de ADN de *A. fumigatus*, pero en seis enfermos, la detección de ADN precedió a la de GM, con una media de adelanto diagnóstico de 61 días (37-155 días)

Tabla XI. Resultados de la técnica de PCR-TR

PCR resultados	Verdadero positivo	Falso negativo	Sensibilidad	VPP	Verdadero negativo	Falso positivo	Epecificidad	VPN
1 resultado positivo	11/12	1/12	91.6%	43,9%	57/71	14/71	80.3%	98.3%
2 resultados positivos	11/12	1/12	91.6%	73,3%	67/71	4/71	94.4%	98.5%
3 resultados positivos	9/12	3/12	75.0%	81,8%	69/71	2/71	97.2%	95.8%

VPP: Valor Predictivo Positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo

Figura 1: Curvas ROC y datos estadísticos en relación a los resultados obtenidos con la técnica de PCR y GM.

Curvas ROC para 3 o más resultados de PCR y GM fueron similares y están superpuestas en la figura

Resultados Diagnósticos	Área Bajo la Curva	95% Intervalo de Confianza	<i>P</i>
Un resultado de PCR positiva	0.860	0.752-0.967	<0.01
Dos o más PCR positivas	0.930	0.834-1.026	<0.01
Tres o más PCR positivas	0.861	0.712-1.010	<0.01
GM positivo	0.861	0.712-1.010	<0.01

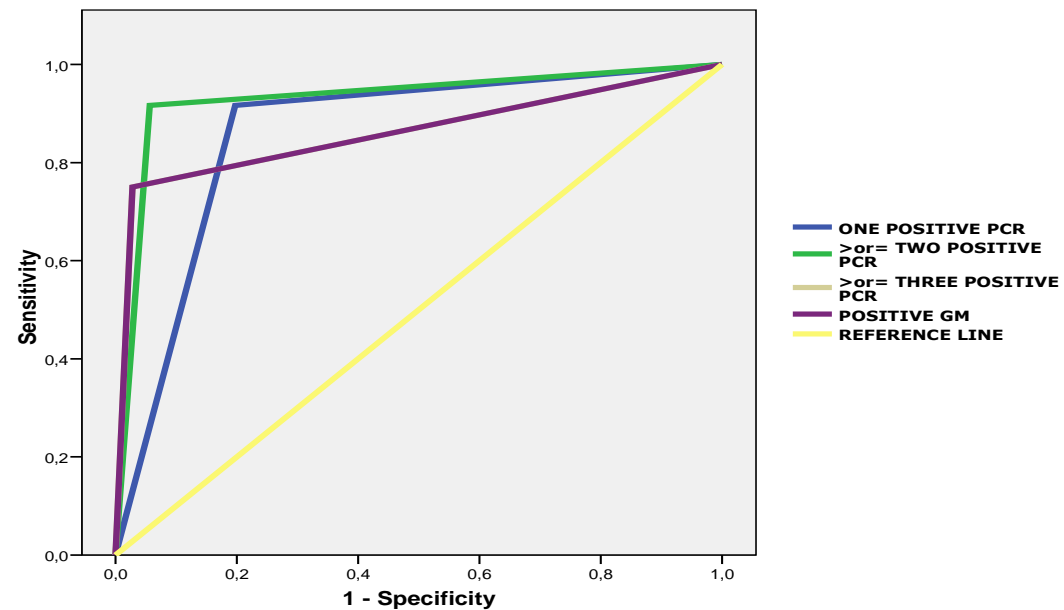
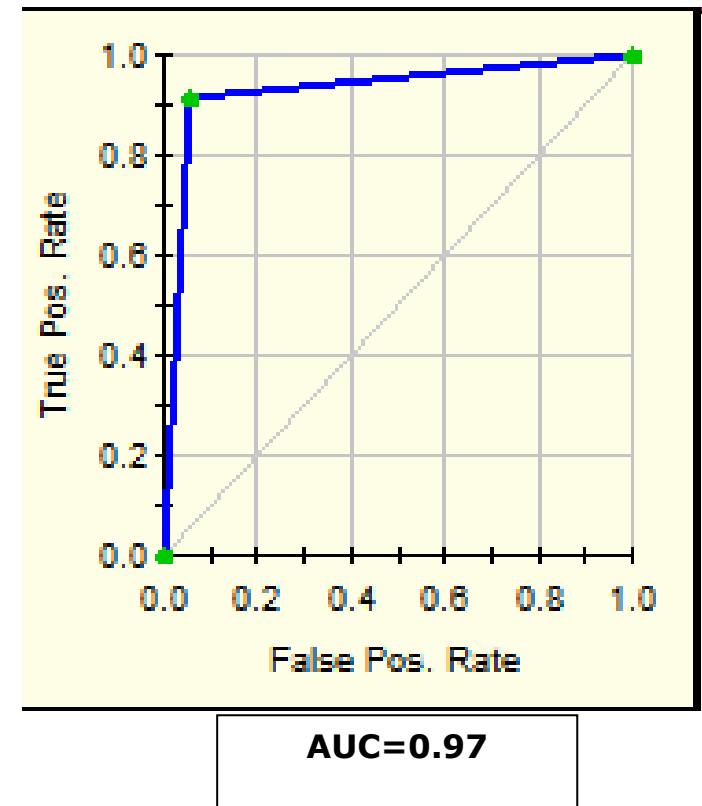
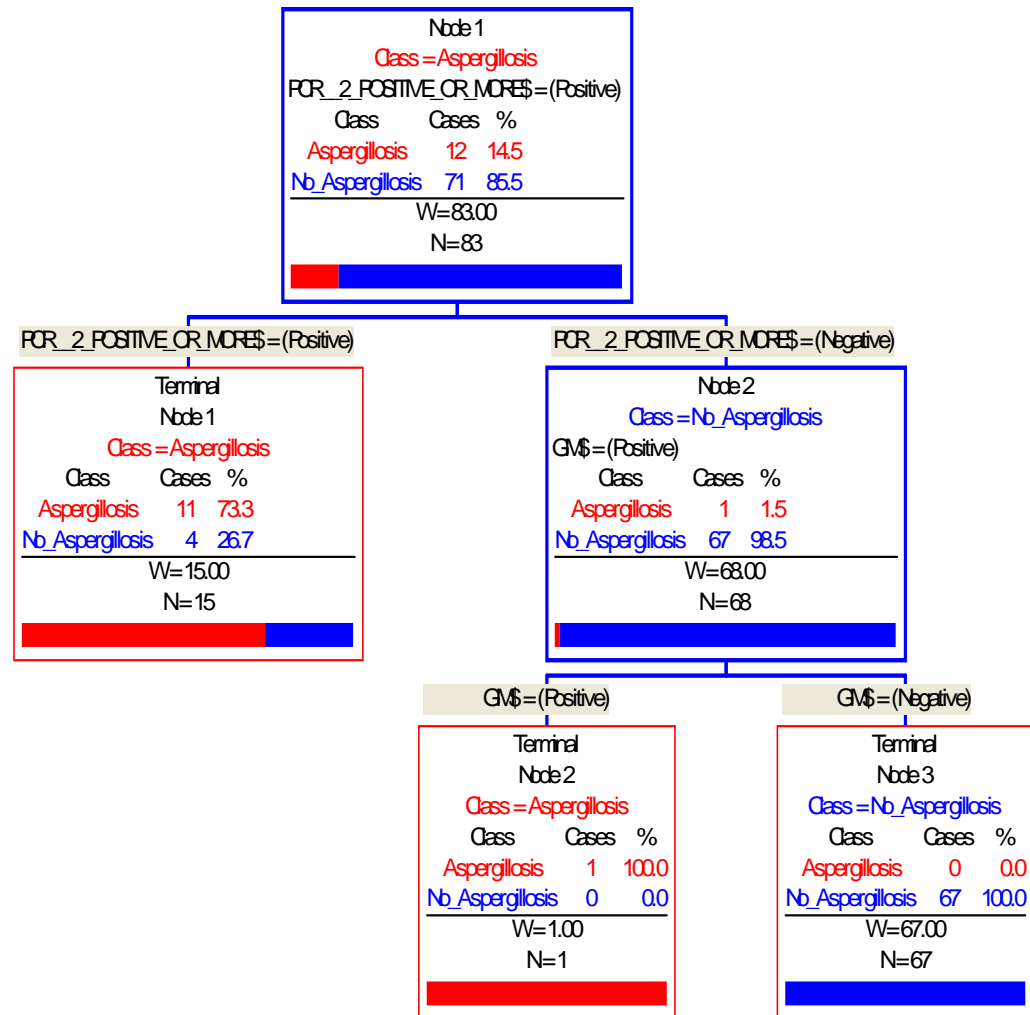


Figura 2: Modelo obtenido mediante análisis CART con dos o más resultados de PCR y GM positivo.

AUC: Área Bajo la Curva.



DISCUSIÓN

En la actualidad, la infección por *Aspergillus* spp. es la principal causa de mortalidad por infección fúngica en el paciente oncohematológico, siendo además, la principal causa de mortalidad de etiología infecciosa en este tipo de pacientes (98).

El pronóstico de la aspergilosis invasiva depende de la resolución de la neutropenia y de la precocidad en el tratamiento. La mortalidad en enfermos con enfermedad diseminada al diagnóstico supera el 80%, independientemente del tratamiento utilizado, reduciéndose a menos de 50% en pacientes con enfermedad localizada (75). En este paciente más que en ningún otro, la precocidad diagnóstica es fundamental para reducir la mortalidad relacionada con la IFI. Estos enfermos sufren una inmunosupresión profunda por lo que la respuesta al tratamiento es muy difícil cuando la infección está avanzada, de ahí la necesidad de técnicas de diagnóstico precoz.

El diagnóstico precoz es difícil de obtener con los métodos convencionales. Por ello, se utilizan fármacos que prevengan el desarrollo de infección por AI en pacientes de riesgo, así como el tratamiento antifúngico empírico en pacientes con neutropenia febril que no responden a tratamiento antibiótico sin causa aparente.

Sin embargo, la utilización generalizada de cualquiera de estas medidas en estos pacientes, conlleva un sobretratamiento, ya que muchos de ellos no desarrollarán AI. Estos fármacos tienen toxicidad y un coste no despreciables. En otras ocasiones, la falta de diagnóstico de certeza genera el infratratamiento de enfermos con AI, ya que se emplean fármacos que parecen no ser las mejores alternativas terapéuticas (215).

Según todos los expertos y los trabajos publicados en los últimos años, el diagnóstico de la aspergilosis y de otras infecciones fúngicas invasoras debe basarse en la utilización de varias técnicas, que permitan detectar precozmente

la infección. La combinación del TACAR y de la cuantificación de antígenos fúngicos ha mejorado el pronóstico de estos enfermos, aunque aún nos encontramos lejos de resolver el problema (78, 122, 172, 216-218).

Todos estos métodos diagnósticos se basan en las determinaciones seriadas, que permiten obtener una visión dinámica de la evolución del enfermo y, en teoría, detectar la infección en sus primeros momentos. Sin embargo, estos métodos presentan algunas limitaciones que deben tomarse en consideración.

Los TACAR seriados producen niveles de radiación que podrían considerarse como inaceptables (216). Además muestran una especificidad baja, ya que otras afecciones pulmonares pueden cursar con el mismo tipo de lesión. Por último, no sirven para identificar el hongo causante de la infección, lo que empieza a tener trascendencia terapéutica ante los distintos fármacos antifúngicos disponibles y los diferentes perfiles de sensibilidad de las especies fúngicas (219). Por otra parte, cuando la imagen radiológica aparece en el TACAR, la AI ya está establecida y la mortalidad en ese momento a pesar del tratamiento antifúngico dirigido es muy alta.

La cuantificación de antígenos ha ayudado también a mejorar el diagnóstico de la aspergilosis invasora, pero los falsos negativos observados en enfermos con profilaxis y los falsos positivos por contaminaciones o fármacos, le han restado fiabilidad diagnóstica (122, 217).

La detección seriada de ADN fúngico es una estrategia diagnóstica que ha sido evaluada con resultados desiguales, como se indicó anteriormente (150, 154, 200, 207-209). La mayoría de los trabajos publicados hasta ahora no utilizan determinación de PCR-TR, lo que conlleva un mayor riesgo de contaminación de la técnica, mayor número de falsos positivos y, por tanto, una menor especificidad de la técnica. Sólo cinco trabajos previos a éste, evalúan la técnica de PCR-TR para el diagnóstico de *Aspergillus* spp. en el paciente oncohematológico (136, 154, 199, 208, 209). De estos trabajos dos utilizan PCR-TR específica para *A. fumigatus*, uno en sangre y otro en suero (154, 208), sólo el primero asume dos PCR positivas como resultado microbiológico

positivo. Sin embargo, varios consensos consideran que dos PCR positivas como criterio microbiológico incrementa la especificidad de la técnica en el diagnóstico de la AI (202).

Por otra parte ninguno de los trabajos realizados hasta el momento para evaluar el papel de la técnica diagnóstica de PCR en tiempo real, utiliza los criterios EORTC-MSG actualizados del 2008 (84), habiendo usado la mayoría de los trabajos los criterios del 2002 (220) o criterios similares no estandarizados (en aquellas publicaciones previas al 2002).

Este hecho conlleva que muchas AI posibles definidas según los criterios previos como la suma del criterio huésped más el criterio microbiológico, hayan pasado en la actualidad a no considerarse AI a no ser que se sume también el criterio radiológico (AI probable) o presentando únicamente el criterio radiológico sumado al huésped, que entonces se considera AI posible, según los últimos criterios. Esto implica un menor número de verdaderos positivos (VP), afectando al VPP, si aplicamos los criterios actualizados.

Esta tesis recoge uno de los estudios más completos sobre la detección seriada de ADN de *A. fumigatus*. Se tomaron prospectivamente muestras de sangre y de suero de enfermos con neutropenia febril en riesgo de AI. Obteniendo muestras de forma bisemanal en todos los pacientes de alto riesgo de AI. La media de muestras disponibles por enfermo fue de 27. Se consideró además un resultado positivo cuando se obtuvieron dos PCR positivas seguidas en menos de 7 días o tres PCR positivas en menos de 12 días, obteniéndose en la mayoría de los pacientes estos resultados positivos con mucha anterioridad al GM oTACAR.

Con esta cantidad de muestras se pudieron realizar varios análisis. En primer lugar, tomando como criterio para definir un resultado positivo por la técnica de PCR el de dos muestras positivas consecutivas, se detectaron 11 de los 12 casos de aspergilosis (91.6%) y sólo se produjeron cuatro falsos positivos, según los criterios EORTC-MSG actualizados del 2008 (84).

Con estas cifras, el VPP fue del 73.3%, lo que permite decir que la detección seriada de ADN fúngico debería considerarse como una técnica diagnóstica fiable, con porcentajes de acierto comparables a los del TACAR o la detección de antígenos fúngicos (172, 183, 218, 221). El VPP para la técnica de GM, fue mucho menor, con un porcentaje del 50%.

En general, tanto las cifras de S, E, VPP y VPN del GM fueron inferiores a la obtenidas con la técnica de PCR-TR (75%, 87,3%, 50% y 95% frente al 91%, 94%, 73% y 98% respectivamente)

Los porcentajes de S, E, VPP y VPN medios de la técnica de PCR-TR en nuestro trabajo fue similar o superior a la de los pocos trabajos descritos hasta ahora, que hayan utilizado técnicas de PCR-TR. La superioridad esté probablemente relacionada con el amplio número de muestras recogidas y con el criterio seleccionado de dos PCR positivas.

Si comparamos los resultados con el trabajo de Suarez et al, el trabajo más reciente publicado hasta ahora, con los mejores resultados y que utiliza suero y PCR-TR para *A. fumigatus* de forma similar a nuestro trabajo, destacamos una menor S en nuestras cifras en comparación con al trabajo de Suarez et al (154), probablemente en relación a que en dicho trabajo se acepta una única PCR como resultado positivo. Por otra parte, hemos obtenido un VPP igualmente menor, en probable relación con lo comentado anteriormente de que en nuestro trabajo se han utilizado los criterios EORTC-MSG actualizados en el 2008 (84).

La cuantificación de ADN fúngico mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real no sirvió para establecer “cut-offs” (puntos de corte) que ayudaran a distinguir entre pacientes colonizados o infectados o entre falsos positivos o verdaderos positivos. Esto se debe a que tanto en suero como en sangre, la cantidad de ADN fúngico era pequeña y las muestras positivas tuvieron unos Ct entre 35 y 40 ciclos, con una media de ADN fúngico de 10-500 fg por µL de muestra. Esta baja cantidad de ADN permite especular con la necesidad de desarrollar técnicas de PCR cuantitativas más sensibles y que la baja

sensibilidad de algunos trabajos previos que evaluaron estas técnicas pueda deberse a la baja cantidad de ADN fúngico en muestras hematológicas (209).

Otro aspecto a reseñar es la comprobación de que la técnica de PCR cuantitativa puede tener un papel complementario a la radiología y a la determinación de GM. El análisis CART demostró que con dos resultados consecutivos positivos por PCR más la cuantificación de GM positiva, el riesgo relativo de aspergilosis era 6.92 veces superior que el de la población control y que el éxito predictivo del algoritmo diagnóstico era del 95.2%. Estas cifras permiten recomendar que ambas técnicas podrían ser utilizadas en enfermos con riesgo alto de aspergilosis.

Para finalizar, uno de los resultados más significativos del estudio es la precocidad diagnóstica. Al disponer de un número tan elevado de muestras y, en algunos casos, tomadas varias semanas antes a la aparición de la aspergilosis invasora, se pudo analizar la precocidad diagnóstica de las técnicas. Debe resaltarse que en los enfermos con aspergilosis, se detectó ADN fúngico mucho antes que GM o que el TACAR detectara la lesión compatible con IFI. El adelanto medio fue de 24 días respecto al TACAR y de 61 respecto al GM.

En los trabajos publicados hasta el momento esta precocidad diagnóstica ha sido descrita de forma infrecuente, haciendo hincapié en la mayoría de los trabajos, en la precocidad con respecto a la clínica, pero casi ningún trabajo evaluó en cifras la precocidad diagnóstica de la PCR en relación al resto de técnicas diagnósticas. En el trabajo de Florent et al (150) se aportan cifras de 17 días de media de adelanto en aquellos pacientes en los que la PCR fue más precoz que el GM y, en ningún caso, se ha descrito una media de precocidad diagnóstica de incluso semanas, como en nuestro trabajo, llegando a observarse en algunos pacientes de nuestro estudio un adelanto de incluso meses.

En aquellos pacientes en los que no se adelantó y se positivizó la PCR a igual tiempo que el GM o el TACAR, se debió a que ambas técnicas diagnósticas se

positivizaron desde el inicio del seguimiento, observándose AI desde los primeros días de dicho seguimiento.

Es difícil hallar una explicación para estos resultados, pues no se conoce mucho sobre la cinética de los componentes fúngicos. Un estudio publicado en el 2006 (222), analizó la cinética in vitro de los marcadores utilizados para el diagnóstico de la aspergilosis invasora. Los autores demostraron que el GM y otros antígenos fúngicos se liberan cuando *Aspergillus* se halla en fase de crecimiento exponencial, mientras que el ADN fúngico se libera cuando las hifas se fragmentan, fenómeno que ocurre de forma natural por autólisis, cuando se limita la cantidad de nutrientes.

Teniendo en cuenta estos datos, nuestro estudio parece indicar que la mayoría de los enfermos que desarrollaron aspergilosis podrían estar colonizados previamente por *Aspergillus*. La profilaxis con itraconazol pudo limitar el crecimiento exponencial del hongo, disminuyendo la cantidad de GM (217), hasta que la infección estuvo lo suficientemente extendida para que la profilaxis fuera ineficaz. Hasta ese momento, el único dato de colonización fue la DNAemia detectada por la técnica de PCR, presuntamente causada por la fragmentación periódica de las hifas. Este dato debería confirmarse realizando un estudio con mayor número de enfermos. En cualquier caso, la detección seriada de ADN de *Aspergillus* ha demostrado tener una gran utilidad diagnóstica, rentabilidad que aumenta cuando se utiliza en combinación con el TACAR y la cuantificación de GM.

Por otra parte, probablemente el factor huésped también desempeñe un papel fundamental en el desarrollo de AI o no en estos pacientes. En nuestro trabajo se observa que en la práctica totalidad de los pacientes con PCR positiva previa al GM y TACAR, en los que puede aceptarse que estaban colonizados por *A. fumigatus*, apareció una AI en fases tardías del seguimiento, en el momento en el que existía una progresión de la enfermedad de base o un empeoramiento generalizado del paciente por otras complicaciones o por el desarrollo de EICH. En esos momentos de deterioro aún mayor del sistema inmune del huésped, fue el momento en el que se positivizó el GM y el TACAR,

permitiendo por tanto el diagnóstico de AI según los criterios EORTC-MSG (84).

Por otra parte, un artículo reciente hace mención a una mayor predisposición al desarrollo de AI en aquellos pacientes receptores de un TPH procedente de un donante con polimorfismos o alteraciones genéticas de los receptores *Toll* tipo 4, unas proteínas de membrana del sistema inmune que intervienen en la defensa de las infecciones fúngicas. En relación con ello, se ha visto que la presencia del haplotipo S4 en el donante se relaciona, de forma estadísticamente significativa, con un mayor riesgo de AI en pacientes sometidos a TPH alogénico de donante no emparentado (15).

Llama la atención en nuestro trabajo que la PCR-TR para *A. fumigatus* no se negativizó en la mayoría de los pacientes al administrarse tratamiento dirigido y eficaz para la AI, esto apoya aún más el concepto de colonización o infección subclínica, puesto que en muchos pacientes aún observándose una mejoría clínica relativa, la infección probablemente se mantenga de forma oculta, ya que el huésped tiene un sistema inmune incapaz de erradicar totalmente la infección y, de hecho, en todos los pacientes que fallecieron, la PCR continuó siendo positiva en el momento de la muerte.

Sin embargo, el dato que nos cuesta más explicar es la existencia de PCR negativas en diferentes muestras entre los resultados positivos, lo que probablemente pueda entenderse porque la técnica debe desarrollarse más para detectar ADN en muestras donde su cantidad sea más pequeña.

La utilidad clínica real de esta estrategia diagnóstica debería analizarse en un nuevo estudio en el que se demuestre que el diagnóstico precoz y el tratamiento anticipado se asocian a un aumento significativo de la supervivencia en estos enfermos.

Si la técnica diagnóstica de PCR en tiempo real llegara a validarse y se pudiera estandarizar su uso, en un futuro con nuevos estudios, su determinación de forma seriada, podría llegar a ser utilizada como método diagnóstico

anticipado, de igual forma que en la práctica diaria utilizamos la antigenemia de CMV para el tratamiento anticipado de la infección por CMV. De esta forma se podría discriminar entre la población que necesita terapia antifúngica, disminuyendo el uso indiscriminado de tratamiento antifúngico profiláctico.

Por otra parte y apoyado por los resultados de este trabajo y otros previos, consideramos que habrá que incluir los resultados de la PCR-TR para el diagnóstico de la AI en el paciente oncohematológico, dentro de los criterios EORTC-MSG. En la versión actual de estos criterios sólo se reconocen como criterios microbiológicos no invasivos el GM y, recientemente, la determinación de BG (84).

Probablemente en un futuro no lejano la PCR-TR pasará a formar parte de dichos criterios, aportando nuevas posibilidades diagnósticas para un problema que aún en la actualidad estamos lejos de resolver y que continúa teniendo elevadas cifras de mortalidad en el paciente oncohematológico.

Habrà que evaluar igualmente en el futuro, el uso de esta técnica entre pacientes no neutropénicos o con una inmunidad no tan afectada como la que presenta el paciente sometido a TPH alogénico. Entre éstos podríamos señalar el paciente oncológico de órgano sólido, el paciente trasplantado de órgano sólido o el paciente crítico, donde actualmente se esta observando un incremento en la incidencia de AI (223).

CONCLUSIONES

1. La técnica de PCR-TR para *Aspergillus fumigatus*, tanto en sangre como en suero, es una técnica útil para el diagnóstico de AI en pacientes con patología hematológica maligna y alto riesgo de micosis; con altos porcentajes de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo
2. La determinación de ADN fúngico de *Aspergillus fumigatus* mediante PCR-TR puede considerarse como una técnica diagnóstica comparable al TACAR o la detección de antígenos fúngicos.
3. La cuantificación de ADN fúngico mediante la técnica de PCR-TR no ha demostrado establecer puntos de corte que ayuden a distinguir entre pacientes colonizados o infectados, siendo más bien una técnica de diagnóstico de infección oculta, con valores de cuantificación similar durante el periodo de infección subclínica y el periodo de AI diagnosticada según los criterios EORTC-MSG.
4. La técnica diagnóstica de PCR-TR para *Aspergillus fumigatus* se adelanta al diagnóstico por imagen mediante TACAR o a la detección de antígenos fúngicos mediante el GM, en semanas o incluso meses, para el diagnóstico de AI en el paciente oncohematológico de alto riesgo de IFI.
5. El uso conjunto de la técnica antigénica de GM y PCR-TR para el diagnóstico precoz de la infección fúngica en el paciente hematológico de alto riesgo, permite incrementar el valor predictivo diagnóstico.

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

Silent and Prolonged DNAemia of *Aspergillus* Detected by Real-time PCR in Neutropenic Patients Receiving Antifungal Prophylaxis.

Y. Meije, M. Cuenca-Estrella , C. Díaz-Pedroche , A. Gómez-López , M. Lizasoain , A. García-Reyne , F. López-Medrano , R. San Juan , A. Lalueza , J.L. Rodríguez-Tudela, J.M. Aguado.

48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) and the Infectious Disease Society of America (IDSA) 46th Annual Meeting. Washington, DC 25-28 Octubre 2008. Abstract M-936

Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia.

Cuenca-Estrella M, Meije Y, Díaz-Pedroche C, Gómez-Lopez A, Buitrago MJ, Bernal-Martínez L, Grande C, Juan RS, Lizasoain M, Rodríguez-Tudela JL, Aguado JM.

J Clin Microbiol. 2009 Feb;47(2):379-84. Epub 2008 Dec 24.

BIBLIOGRAFÍA

1. Viscoli C. Management of infection in cancer patients. studies of the EORTC International Antimicrobial Therapy Group (IATG). *Eur J Cancer*. 2002 Mar;38 Suppl 4:S82-7.
2. Ljungman P, Reusser P, de la Camara R, Einsele H, Engelhard D, Ribaud P, et al. Management of CMV infections: recommendations from the infectious diseases working party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Jun;33(11):1075-81.
3. Donowitz GR, Maki DG, Crnich CJ, Pappas PG, Rolston KV. Infections in the neutropenic patient--new views of an old problem. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001:113-39.
4. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2002 Apr 1;34(7):909-17.
5. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis*. 2009 Feb 1;48(3):265-73.
6. Hachem RY, Kontoyiannis DP, Chemaly RF, Jiang Y, Reitzel R, Raad I. Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) beta-D-glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. *J Clin Microbiol*. 2009 Jan;47(1):129-33.
7. Lizasoain M, Ortiz MC, Lumbreras C. Inmunodepresión, Infección y Cáncer. En: Valentín Maganto V dir. *Oncología en atención primaria*. Madrid: Novartis; 2003. p. 209-224.
8. Kontoyiannis DP, Bodey GP. Invasive aspergillosis in 2002: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Mar;21(3):161-72.
9. Schaffner A. Therapeutic concentrations of glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages without impairing their responsiveness to gamma interferon. *J Clin Invest*. 1985 Nov;76(5):1755-64.
10. Schneemann M, Schaffner A. Host defense mechanism in *Aspergillus fumigatus* infections. *Contrib Microbiol*. 1999;2:57-68.
11. Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, d'Ostiani CF, et al. Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses. *J Infect Dis*. 1999 Dec;180(6):1957-68.
12. Nagai H, Guo J, Choi H, Kurup V. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha protect mice from invasive aspergillosis. *J Infect Dis*. 1995 Dec;172(6):1554-60.
13. Kullberg BJ. Trends in immunotherapy of fungal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1997 Jan;16(1):51-5.
14. Roilides E, Sein T, Roden M, Schaufele RL, Walsh TJ. Elevated serum concentrations of interleukin-10 in nonneutropenic patients with invasive aspergillosis. *J Infect Dis*. 2001 Feb 1;183(3):518-20.

15. Bochud PY, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1766-77.
16. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Bow EJ, Brown AE, Calandra T, et al. 2002 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis*. 2002 Mar 15;34(6):730-51.
17. Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med*. 1966 Feb;64(2):328-40.
18. Pizzo PA. Fever in immunocompromised patients. *N Engl J Med*. 1999 Sep 16;341(12):893-900.
19. Wald A, Leisenring W, van Burik JA, Bowden RA. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J Infect Dis*. 1997 Jun;175(6):1459-66.
20. Gerson SL, Talbot GH, Hurwitz S, Strom BL, Lusk EJ, Cassileth PA. Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med*. 1984 Mar;100(3):345-51.
21. Denning DW, Marinus A, Cohen J, Spence D, Herbrecht R, Pagano L, et al. An EORTC multicentre prospective survey of invasive aspergillosis in haematological patients: diagnosis and therapeutic outcome. EORTC Invasive Fungal Infections Cooperative Group. *J Infect*. 1998 Sep;37(2):173-80.
22. Link H, Bohme A, Cornely OA, Hoffken K, Kellner O, Kern WV, et al. Antimicrobial therapy of unexplained fever in neutropenic patients--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO), Study Group Interventional Therapy of Unexplained Fever, Arbeitsgemeinschaft Supportivmassnahmen in der Onkologie (ASO) of the Deutsche Krebsgesellschaft (DKG-German Cancer Society). *Ann Hematol*. 2003 Oct;82 Suppl 2:S105-17.
23. Martino R, Viscoli C. Empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent or recurrent fever of unknown origin. *Br J Haematol*. 2006 Jan;132(2):138-54.
24. Prentice HG, Kibbler CC, Prentice AG. Towards a targeted, risk-based, antifungal strategy in neutropenic patients. *Br J Haematol*. 2000 Aug;110(2):273-84.
25. Weinberger M, Elattar I, Marshall D, Steinberg SM, Redner RL, Young NS, et al. Patterns of infection in patients with aplastic anemia and the emergence of *Aspergillus* as a major cause of death. *Medicine (Baltimore)*. 1992 Jan;71(1):24-43.
26. Munoz P, Burillo A, Bouza E. Environmental surveillance and other control measures in the prevention of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7 Suppl 2:38-45.
27. Anaissie EJ, Kontoyiannis DP, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson L, Lerner S, et al. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Ann Intern Med*. 1998 Oct 1;129(7):559-66.

28. Juliusson G. Complications in the treatment of CLL with purine analogues. *Hematol Cell Ther.* 1997 Nov;39 Suppl 1:S41-4.
29. Samonis G, Kontoyiannis DP. Infectious complications of purine analog therapy. *Curr Opin Infect Dis.* 2001 Aug;14(4):409-13.
30. Wendtner CM RM, Schweighofer CD, Fingerle-Rowson G, Campe H, Jager G, et al. Consolidation with alemtuzumab in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) in first remission--experience on safety and efficacy within a randomized multicenter phase III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Leukemia* 2004;18(6):1093-1101.
31. Batlle M, Ribera JM, Oriol A, Rodriguez L, Cirauqui B, Xicoy B, et al. [Pneumonia in patients with chronic lymphocytic leukemia. Study of 30 episodes]. *Med Clin (Barc).* 2001 May 26;116(19):738-40.
32. Mohty M, Jacot W, Faucher C, Bay JO, Zandotti C, Collet L, et al. Infectious complications following allogeneic HLA-identical sibling transplantation with antithymocyte globulin-based reduced intensity preparative regimen. *Leukemia.* 2003 Nov;17(11):2168-77.
33. Panigrahi S, Nagler A, Or R, Wolf DG, Slavin S, Shapira MY. Indolent aspergillus arthritis complicating fludarabine-based non-myeloablative stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Mar;27(6):659-61.
34. Fleischhack G, Hasan C, Graf N, Mann G, Bode U. IDA-FLAG (idarubicin, fludarabine, cytarabine, G-CSF), an effective remission-induction therapy for poor-prognosis AML of childhood prior to allogeneic or autologous bone marrow transplantation: experiences of a phase II trial. *Br J Haematol.* 1998 Aug;102(3):647-55.
35. Thursky KA, Worth LJ, Seymour JF, Miles Prince H, Slavin MA. Spectrum of infection, risk and recommendations for prophylaxis and screening among patients with lymphoproliferative disorders treated with alemtuzumab*. *Br J Haematol.* 2006 Jan;132(1):3-12.
36. Keating MJ, Flinn I, Jain V, Binet JL, Hillmen P, Byrd J, et al. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3554-61.
37. Peter E, Bakri F, Ball DM, Cheney RT, Segal BH. Invasive pulmonary filamentous fungal infection in a patient receiving inhaled corticosteroid therapy. *Clin Infect Dis.* 2002 Sep 1;35(5):e54-6.
38. Leav BA, Fanburg B, Hadley S. Invasive pulmonary aspergillosis associated with high-dose inhaled fluticasone. *N Engl J Med.* 2000 Aug 24;343(8):586.
39. Rello J, Esandi ME, Mariscal D, Gallego M, Domingo C, Valles J. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: report of eight cases and review. *Clin Infect Dis.* 1998 Jun;26(6):1473-5.
40. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet.* 2003 Nov 29;362(9398):1828-38.
41. Rinehart JJ, Balcerzak SP, Sagone AL, LoBuglio AF. Effects of corticosteroids on human monocyte function. *J Clin Invest.* 1974 Dec;54(6):1337-43.

42. Gumbo T, Isada CM, Hall G, Karafa MT, Gordon SM. *Candida glabrata* Fungemia. Clinical features of 139 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1999 Jul;78(4):220-7.
43. Kontoyiannis DP, Vaziri I, Hanna HA, Boktour M, Thornby J, Hachem R, et al. Risk Factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin Infect Dis*. 2001 Nov 15;33(10):1676-81.
44. Nucci M, Colombo AL. Risk factors for breakthrough candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Mar;21(3):209-11.
45. Ng TT, Robson GD, Denning DW. Hydrocortisone-enhanced growth of *Aspergillus* spp.: implications for pathogenesis. *Microbiology*. 1994 Sep;140 (Pt 9):2475-9.
46. Berenguer J, Allende MC, Lee JW, Garrett K, Lyman C, Ali NM, et al. Pathogenesis of pulmonary aspergillosis. Granulocytopenia versus cyclosporine and methylprednisolone-induced immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Sep;152(3):1079-86.
47. Balloy V, Huerre M, Latge JP, Chignard M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun*. 2005 Jan;73(1):494-503.
48. Marr KA, Carter RA, Boeckh M, Martin P, Corey L. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4358-66.
49. Ribaud P, Chastang C, Latge JP, Baffroy-Lafitte L, Parquet N, Devergie A, et al. Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis*. 1999 Feb;28(2):322-30.
50. O'Donnell MR, Schmidt GM, Tegtmeier BR, Faucett C, Fahey JL, Ito J, et al. Prediction of systemic fungal infection in allogeneic marrow recipients: impact of amphotericin prophylaxis in high-risk patients. *J Clin Oncol*. 1994 Apr;12(4):827-34.
51. Morrison VA, Haake RJ, Weisdorf DJ. Non-*Candida* fungal infections after bone marrow transplantation: risk factors and outcome. *Am J Med*. 1994 Jun;96(6):497-503.
52. Jimenez C, Lumbreras C, Aguado JM, Loinaz C, Paseiro G, Andres A, et al. Successful treatment of mucor infection after liver or pancreas-kidney transplantation. *Transplantation*. 2002 Feb 15;73(3):476-80.
53. Kontoyiannis DP, Wessel VC, Bodey GP, Rolston KV. Zygomycosis in the 1990s in a tertiary-care cancer center. *Clin Infect Dis*. 2000 Jun;30(6):851-6.
54. Rossmann SN, Cernoch PL, Davis JR. Dematiaceous fungi are an increasing cause of human disease. *Clin Infect Dis*. 1996 Jan;22(1):73-80.
55. Nucci M, Anaissie EJ, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Solza C, et al. Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. *Cancer*. 2003 Jul 15;98(2):315-9.
56. Ponton J, Ruchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, Guarro J, et al. Emerging pathogens. *Med Mycol*. 2000;38 Suppl 1:225-36.

57. Ochs L, Shu XO, Miller J, Enright H, Wagner J, Filipovich A, et al. Late infections after allogeneic bone marrow transplantations: comparison of incidence in related and unrelated donor transplant recipients. *Blood*. 1995 Nov 15;86(10):3979-86.
58. Saavedra S, Sanz GF, Jarque I, Moscardo F, Jimenez C, Lorenzo I, et al. Early infections in adult patients undergoing unrelated donor cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002 Dec;30(12):937-43.
59. Hagen EA, Stern H, Porter D, Duffy K, Foley K, Luger S, et al. High rate of invasive fungal infections following nonmyeloablative allogeneic transplantation. *Clin Infect Dis*. 2003 Jan 1;36(1):9-15.
60. Crippa F, Holmberg L, Carter RA, Hooper H, Marr KA, Bensinger W, et al. Infectious complications after autologous CD34-selected peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(5):281-9.
61. Grow WB, Moreb JS, Roque D, Manion K, Leather H, Reddy V, et al. Late onset of invasive aspergillus infection in bone marrow transplant patients at a university hospital. *Bone Marrow Transplant*. 2002 Jan;29(1):15-9.
62. Martino R, Subira M. Invasive fungal infections in hematology: new trends. *Ann Hematol*. 2002 May;81(5):233-43.
63. Cordonnier C, Ribaud P, Herbrecht R, Milpied N, Valteau-Couanet D, Morgan C, et al. Prognostic factors for death due to invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year retrospective study of consecutive patients at French transplantation centers. *Clin Infect Dis*. 2006 Apr 1;42(7):955-63.
64. Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby KA, Marr KA. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin Infect Dis*. 2008 Oct 15;47(8):1041-50.
65. Imhof A, Balajee SA, Fredricks DN, Englund JA, Marr KA. Breakthrough fungal infections in stem cell transplant recipients receiving voriconazole. *Clin Infect Dis*. 2004 Sep 1;39(5):743-6.
66. Siwek GT, Dodgson KJ, de Magalhaes-Silverman M, Bartelt LA, Kilborn SB, Hoth PL, et al. Invasive zygomycosis in hematopoietic stem cell transplant recipients receiving voriconazole prophylaxis. *Clin Infect Dis*. 2004 Aug 15;39(4):584-7.
67. Kobayashi K, Kami M, Murashige N, Kishi Y, Fujisaki G, Mitamura T. Breakthrough zygomycosis during voriconazole treatment for invasive aspergillosis. *Haematologica*. 2004 Nov;89(11):ECR42.
68. Kontoyiannis DP, Lionakis MS, Lewis RE, Chamilos G, Healy M, Perego C, et al. Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of Aspergillus-active antifungal therapy: a case-control observational study of 27 recent cases. *J Infect Dis*. 2005 Apr 15;191(8):1350-60.
69. Oren I. Breakthrough zygomycosis during empirical voriconazole therapy in febrile patients with neutropenia. *Clin Infect Dis*. 2005 Mar 1;40(5):770-1.

70. Schalk E, Mohren M, Jentsch-Ullrich K, Dombrowski F, Franke A, Koenigsmann M. Zygomycoses in patients with acute leukaemia. *Ann Hematol.* 2006 May;85(5):327-32.
71. Pagano L, Gleissner B, Fianchi L. Breakthrough zygomycosis and voriconazole. *J Infect Dis.* 2005 Oct 15;192(8):1496-7; author reply 7.
72. van Well GT, van Groenigen I, Debets-Ossenkopp YJ, van Furth AM, Zwaan CM. Zygomycete infection following voriconazole prophylaxis. *Lancet Infect Dis.* 2005 Sep;5(9):594.
73. Singh N, Paterson DL. Aspergillus infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Jan;18(1):44-69.
74. Fukuda T, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB, Maloney DG, et al. Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood.* 2003 Aug 1;102(3):827-33.
75. Denning DW. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 1996 Sep;23(3):608-15.
76. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2001 Feb 1;32(3):358-66.
77. Herbrecht R. Improving the outcome of invasive aspergillosis: new diagnostic tools and new therapeutic strategies. *Ann Hematol.* 2002;81 Suppl 2:S52-3.
78. Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis.* 2007 Feb 15;44(4):531-40.
79. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med.* 2002 Aug 8;347(6):408-15.
80. Chandrasekar PH, Alangaden G, Manavathu E. Aspergillus: an increasing problem in tertiary care hospitals? *Clin Infect Dis.* 2000 Jun;30(6):984-5.
81. Vogeser M, Haas A, Aust D, Ruckdeschel G. Postmortem analysis of invasive aspergillosis in a tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997 Jan;16(1):1-6.
82. van Burik JH, Leisenring W, Myerson D, Hackman RC, Shulman HM, Sale GE, et al. The effect of prophylactic fluconazole on the clinical spectrum of fungal diseases in bone marrow transplant recipients with special attention to hepatic candidiasis. An autopsy study of 355 patients. *Medicine (Baltimore).* 1998 Jul;77(4):246-54.
83. Nivoix Y, Velten M, Letscher-Bru V, Moghaddam A, Natarajan-Ame S, Fohrer C, et al. Factors associated with overall and attributable mortality in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* 2008 Nov 1;47(9):1176-84.
84. Pauw BD. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases* 2008;46:1813–21.
85. Patterson TF. Género Aspergillus. En: Mandell, Douglas, Bennett dir. *Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica.* Madrid: Elsevier; 2006. p. 2958-2973. .

86. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998 Apr;26(4):781-803; quiz 4-5.
87. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Apr;12(2):310-50.
88. Rementeria A, Lopez-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Ponton J, et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol*. 2005 Mar;22(1):1-23.
89. Lewis RE, Wiederhold NP, Lionakis MS, Prince RA, Kontoyiannis DP. Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *J Clin Microbiol*. 2005 Dec;43(12):6120-2.
90. Stanzani M, Orciuolo E, Lewis R, Kontoyiannis DP, Martins SL, St John LS, et al. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2258-65.
91. Reeves EP, Messina CG, Doyle S, Kavanagh K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia*. 2004 Jul;158(1):73-9.
92. Rinaldi MG. Problems in the diagnosis of invasive fungal diseases. *Rev Infect Dis*. 1991 May-Jun;13(3):493-5.
93. Young RC, Bennett JE, Vogel CL, Carbone PP, DeVita VT. Aspergillosis. The spectrum of the disease in 98 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1970 Mar;49(2):147-73.
94. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect*. 1996 Jul;33(1):23-32.
95. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, et al. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2001 Dec 1;33(11):1824-33.
96. Horvath JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Med*. 1996 Feb;100(2):171-8.
97. Yu VL, Muder RR, Poorsattar A. Significance of isolation of *Aspergillus* from the respiratory tract in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Results from a three-year prospective study. *Am J Med*. 1986 Aug;81(2):249-54.
98. Jones BL, McLintock LA. Impact of diagnostic markers on early antifungal therapy. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Dec;16(6):521-6.
99. Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ. The value of bronchoalveolar lavage and bronchial washings in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Respir Med*. 1992 May;86(3):243-8.
100. Kahn FW, Jones JM, England DM. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol*. 1986 Oct;86(4):518-23.
101. Huaranga AJ, Leyva FJ, Signes-Costa J, Morice RC, Raad I, Darwish AA, et al. Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pulmonary complications of bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant*. 2000 May;25(9):975-9.

102. Jantunen E, Piilonen A, Volin L, Parkkali T, Koukila-Kahkola P, Ruutu T, et al. Diagnostic aspects of invasive *Aspergillus* infections in allogeneic BMT recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Apr;25(8):867-71.
103. Kontoyiannis DP, Sumoza D, Tarrand J, Bodey GP, Storey R, Raad, II. Significance of aspergillemia in patients with cancer: a 10-year study. *Clin Infect Dis*. 2000 Jul;31(1):188-9.
104. Heussel CP, Kauczor HU, Heussel GE, Fischer B, Begerich M, Mildenerberger P, et al. Pneumonia in febrile neutropenic patients and in bone marrow and blood stem-cell transplant recipients: use of high-resolution computed tomography. *J Clin Oncol*. 1999 Mar;17(3):796-805.
105. Mori M, Galvin JR, Barloon TJ, Gingrich RD, Stanford W. Fungal pulmonary infections after bone marrow transplantation: evaluation with radiography and CT. *Radiology*. 1991 Mar;178(3):721-6.
106. Blum U, Windfuhr M, Buitrago-Tellez C, Sigmund G, Herbst EW, Langer M. Invasive pulmonary aspergillosis. MRI, CT, and plain radiographic findings and their contribution for early diagnosis. *Chest*. 1994 Oct;106(4):1156-61.
107. Kuhlman JE, Fishman EK, Siegelman SS. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: characteristic findings on CT, the CT halo sign, and the role of CT in early diagnosis. *Radiology*. 1985 Dec;157(3):611-4.
108. Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, Couaillier JF, Durand C, Cuisenier B, et al. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol*. 1997 Jan;15(1):139-47.
109. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Casasnovas O, Denning DW, Mannone L, et al. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol*. 2001 Jan 1;19(1):253-9.
110. Pagano L, Ricci P, Nosari A, Tonso A, Buelli M, Montillo M, et al. Fatal haemoptysis in pulmonary filamentous mycosis: an underevaluated cause of death in patients with acute leukaemia in haematological complete remission. A retrospective study and review of the literature. *Gimema Infection Program (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto)*. *Br J Haematol*. 1995 Mar;89(3):500-5.
111. Bernard A, Caillot D, Couaillier JF, Casasnovas O, Guy H, Favre JP. Surgical management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Ann Thorac Surg*. 1997 Nov;64(5):1441-7.
112. Caillot D, Mannone L, Cuisenier B, Couaillier JF. Role of early diagnosis and aggressive surgery in the management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7 Suppl 2:54-61.
113. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*. 2004 Jun;4(6):349-57.

114. Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latge JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1995 Feb;33(2):497-500.
115. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008 Feb 1;46(3):327-60.
116. Anaissie EJ. Trial design for mold-active agents: time to break the mold--aspergillosis in neutropenic adults. *Clin Infect Dis.* 2007 May 15;44(10):1298-306.
117. Woods G, Miceli MH, Graziutti ML, Zhao W, Barlogie B, Anaissie E. Serum *Aspergillus* galactomannan antigen values strongly correlate with outcome of invasive aspergillosis: a study of 56 patients with hematologic cancer. *Cancer.* 2007 Aug 15;110(4):830-4.
118. Boutboul F, Alberti C, Leblanc T, Sulahian A, Gluckman E, Derouin F, et al. Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: increasing antigenemia is associated with progressive disease. *Clin Infect Dis.* 2002 Apr 1;34(7):939-43.
119. Patterson TF, Miniter P, Ryan JL, Andriole VT. Effect of immunosuppression and amphotericin B on *Aspergillus* antigenemia in an experimental model. *J Infect Dis.* 1988 Aug;158(2):415-22.
120. Maertens J, Buve K, Theunissen K, Meersseman W, Verbeken E, Verhoef G, et al. Galactomannan serves as a surrogate endpoint for outcome of pulmonary invasive aspergillosis in neutropenic hematology patients. *Cancer.* 2009 Jan 15;115(2):355-62.
121. Maertens J, Verhaegen J, Demuynck H, Brock P, Verhoef G, Vandenberghe P, et al. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1999 Oct;37(10):3223-8.
122. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2006 May 15;42(10):1417-27.
123. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, Bijlmer HA, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromized patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008(4):CD007394.
124. Tanriover MD, Ascioglu S, Altun B, Uzun O. Galactomannan on the stage: prospective evaluation of the applicability in routine practice and surveillance. *Mycoses.* 2008 Nov 10.
125. McLintock LA, Jones BL. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Br J Haematol.* 2004 Aug;126(3):289-97.
126. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 2005 Oct;5(10):609-22.
127. Fortun J, Martin-Davila P, Alvarez ME, Sanchez-Sousa A, Quereda C, Navas E, et al. *Aspergillus* antigenemia sandwich-enzyme immunoassay test as a serodiagnostic method for invasive aspergillosis in liver transplant recipients. *Transplantation.* 2001 Jan 15;71(1):145-9.

128. Herbrecht R, Letscher-Bru V, Oprea C, Lioure B, Waller J, Campos F, et al. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2002 Apr 1;20(7):1898-906.
129. Becker MJ, de Marie S, Willemse D, Verbrugh HA, Bakker-Woudenberg IA. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J Clin Microbiol*. 2000 Apr;38(4):1434-8.
130. Hercules C. Platelia [package insert] Bio-rad. 2003.
131. Bretagne S, Marmorat-Khuong A, Kuentz M, Latge JP, Bart-Delabesse E, Cordonnier C. Serum Aspergillus galactomannan antigen testing by sandwich ELISA: practical use in neutropenic patients. *J Infect*. 1997 Jul;35(1):7-15.
132. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, Dhedin N, Rieux C, Cordonnier C. Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998 Jun;26(6):1407-12.
133. Buchheidt D, Hummel M, Schleiermacher D, Spiess B, Schwerdtfeger R, Cornely OA, et al. Prospective clinical evaluation of a LightCycler-mediated polymerase chain reaction assay, a nested-PCR assay and a galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay for detection of invasive aspergillosis in neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol*. 2004 Apr;125(2):196-202.
134. Costa C, Costa JM, Desterke C, Botterel F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):2224-7.
135. Jarque I, Andreu R, Salavert M, Gomez D, Peman J, Gobernado M, et al. [Value of Aspergillus galactomannan antigen detection in the diagnosis and follow-up of invasive aspergillosis in hematological patients]. *Rev Iberoam Micol*. 2003 Sep;20(3):116-8.
136. Kami M, Fukui T, Ogawa S, Kazuyama Y, Machida U, Tanaka Y, et al. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2001 Nov 1;33(9):1504-12.
137. Machetti M, Feasi M, Mordini N, Van Lint MT, Bacigalupo A, Latge JP, et al. Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 1998 May;21(9):917-21.
138. Maertens J, Van Eldere J, Verhaegen J, Verbeken E, Verschakelen J, Boogaerts M. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Infect Dis*. 2002 Nov 1;186(9):1297-306.
139. Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, Lagrou K, Verhaegen J, Boogaerts M, et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br J Haematol*. 2004 Sep;126(6):852-60.

140. Marr KA, Balajee SA, McLaughlin L, Tabouret M, Bentsen C, Walsh TJ. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis.* 2004 Aug 1;190(3):641-9.
141. Moragues MD, Amutio E, Garcia-Ruiz JC, Ponton J. [Usefulness of galactomannan detection in the diagnosis and follow-up of hematological patients with invasive aspergillosis]. *Rev Iberoam Micol.* 2003 Sep;20(3):103-10.
142. Pazos C, del Palacio A. [Early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with bi-weekly serial screening of circulating galactomannan by Platelia Aspergillus]. *Rev Iberoam Micol.* 2003 Sep;20(3):99-102.
143. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, Ambroise-Thomas P, et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2003 May;41(5):2184-6.
144. Rovira M, Jimenez M, De La Bellacasa JP, Mensa J, Rafel M, Ortega M, et al. Detection of *Aspergillus* galactomannan by enzyme immunoabsorbent assay in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective study. *Transplantation.* 2004 Apr 27;77(8):1260-4.
145. Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix C, Derouin F. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer.* 2001 Jan 15;91(2):311-8.
146. Sulahian A, Tabouret M, Ribaud P, Sarfati J, Gluckman E, Latge JP, et al. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996 Feb;15(2):139-45.
147. Ulusakarya A, Chachaty E, Vantelon JM, Youssef A, Tancrede C, Pico JL, et al. Surveillance of *Aspergillus* galactomannan antigenemia for invasive aspergillosis by enzyme-linked immunosorbent assay in neutropenic patients treated for hematological malignancies. *Hematol J.* 2000;1(2):111-6.
148. Verweij PE, Stynen D, Rijs AJ, de Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1912-4.
149. Yoo JH, Choi JH, Choi SM, Lee DG, Shin WS, Min WS, et al. Application of nucleic acid sequence-based amplification for diagnosis of and monitoring the clinical course of invasive aspergillosis in patients with hematologic diseases. *Clin Infect Dis.* 2005 Feb 1;40(3):392-8.
150. Florent M, Katsahian S, Vekhoff A, Levy V, Rio B, Marie JP, et al. Prospective evaluation of a polymerase chain reaction-ELISA targeted to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* for the early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *J Infect Dis.* 2006 Mar 1;193(5):741-7.
151. Busca A, Locatelli F, Barbui A, Limerutti G, Serra R, Libertucci D, et al. Usefulness of sequential *Aspergillus* galactomannan antigen detection combined with early radiologic

- evaluation for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Transplant Proc.* 2006 Jun;38(5):1610-3.
152. Lai CC, Hsu HL, Lee LN, Hsueh PR. Assessment of Platelia Aspergillus enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2007 Apr;40(2):148-53.
153. Foy PC, van Burik JA, Weisdorf DJ. Galactomannan antigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 Apr;13(4):440-3.
154. Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahe V, et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J Clin Microbiol.* 2008 Nov;46(11):3772-7.
155. Siemann M, Koch-Dorfler M, Gaude M. False-positive results in premature infants with the Platelia Aspergillus sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycoses.* 1998 Nov;41(9-10):373-7.
156. Gangneux JP, Lavarde D, Bretagne S, Guiguen C, Gandemer V. Transient aspergillus antigenaemia: think of milk. *Lancet.* 2002 Apr 6;359(9313):1251.
157. Mennink-Kersten MA, Klont RR, Warris A, Op den Camp HJ, Verweij PE. Bifidobacterium lipoteichoic acid and false ELISA reactivity in aspergillus antigen detection. *Lancet.* 2004 Jan 24;363(9405):325-7.
158. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Klont RR, Warris A, Gavini F, Op den Camp HJ, et al. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):3925-31.
159. Viscoli C, Machetti M, Cappellano P, Bucci B, Bruzzi P, Van Lint MT, et al. False-positive galactomannan platelia Aspergillus test results for patients receiving piperacillin-tazobactam. *Clin Infect Dis.* 2004 Mar 15;38(6):913-6.
160. Sulahian A, Touratier S, Ribaud P. False positive test for aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *N Engl J Med.* 2003 Dec 11;349(24):2366-7.
161. Adam O, Auperin A, Wilquin F, Bourhis JH, Gachot B, Chachaty E. Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive Aspergillus galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis.* 2004 Mar 15;38(6):917-20.
162. Aubry A, Porcher R, Bottero J, Touratier S, Leblanc T, Brethon B, et al. Occurrence and kinetics of false-positive Aspergillus galactomannan test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol.* 2006 Feb;44(2):389-94.
163. Bart-Delabesse E, Basile M, Al Jijakli A, Souville D, Gay F, Philippe B, et al. Detection of Aspergillus galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):5214-20.

164. Fortun J, Martin-Davila P, Alvarez ME, Norman F, Sanchez-Sousa A, Gajate L, et al. False-positive results of *Aspergillus* galactomannan antigenemia in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2009 Jan 27;87(2):256-60.
165. Surmont I, Stockman W. Gluconate-containing intravenous solutions: another cause of false-positive galactomannan assay reactivity. *J Clin Microbiol*. 2007 Apr;45(4):1373.
166. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Kako S, Shinohara A, Nakasone H, et al. False-positive *Aspergillus* galactomannan antigenaemia after haematopoietic stem cell transplantation. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Feb;61(2):411-6.
167. Swanink CM, Meis JF, Rijs AJ, Donnelly JP, Verweij PE. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus* galactomannan. *J Clin Microbiol*. 1997 Jan;35(1):257-60.
168. Wheat LJ, Hackett E, Durkin M, Connolly P, Petraitiene R, Walsh TJ, et al. Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the BioRad Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol*. 2007 May;14(5):638-40.
169. Dalle F, Charles PE, Blanc K, Caillot D, Chavanet P, Dromer F, et al. *Cryptococcus neoformans* Galactoxylomannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with *Aspergillus* Galactomannan. *J Clin Microbiol*. 2005 Jun;43(6):2929-31.
170. Huang YT, Hung CC, Liao CH, Sun HY, Chang SC, Chen YC. Detection of circulating galactomannan in serum samples for diagnosis of *Penicillium marneffei* infection and cryptococcosis among patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*. 2007 Sep;45(9):2858-62.
171. Cummings JR, Jamison GR, Boudreaux JW, Howles MJ, Walsh TJ, Hayden RT. Cross-reactivity of non-*Aspergillus* fungal species in the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007 Sep;59(1):113-5.
172. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Verschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clin Infect Dis*. 2005 Nov 1;41(9):1242-50.
173. Weisser M, Rausch C, Droll A, Simcock M, Sendi P, Steffen I, et al. Galactomannan does not precede major signs on a pulmonary computerized tomographic scan suggestive of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *Clin Infect Dis*. 2005 Oct 15;41(8):1143-9.
174. Klont RR, Mennink-Kersten MA, Verweij PE. Utility of *Aspergillus* antigen detection in specimens other than serum specimens. *Clin Infect Dis*. 2004 Nov 15;39(10):1467-74.
175. Ansorg R, Heintschel von Heinegg E, Rath PM. *Aspergillus* antigenuria compared to antigenemia in bone marrow transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994 Jul;13(7):582-9.
176. Becker MJ, Lugtenburg EJ, Cornelissen JJ, Van Der Schee C, Hoogsteden HC, De Marie S. Galactomannan detection in computerized tomography-based broncho-alveolar lavage

fluid and serum in haematological patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Br J Haematol*. 2003 May;121(3):448-57.

177. Musher B, Fredricks D, Leisenring W, Balajee SA, Smith C, Marr KA. Aspergillus galactomannan enzyme immunoassay and quantitative PCR for diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5517-22.

178. Verweij PE, Brinkman K, Kremer HP, Kullberg BJ, Meis JF. Aspergillus meningitis: diagnosis by non-culture-based microbiological methods and management. *J Clin Microbiol*. 1999 Apr;37(4):1186-9.

179. Viscoli C, Machetti M, Gazzola P, De Maria A, Paola D, Van Lint MT, et al. Aspergillus galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2002 Apr;40(4):1496-9.

180. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Ishikawa N, et al. Plasma (1-->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol*. 1995 Dec;33(12):3115-8.

181. Pazos C, Ponton J, Del Palacio A. Contribution of (1->3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan;43(1):299-305.

182. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis*. 2004 Jul 15;39(2):199-205.

183. Obayashi T, Negishi K, Suzuki T, Funata N. Reappraisal of the serum (1-->3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 15;46(12):1864-70.

184. Obayashi T. (1-->3)-beta-D-glucanemia in deep mycosis. *Mediators Inflamm*. 1997;6(4):271-3.

185. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, et al. Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet*. 1995 Jan 7;345(8941):17-20.

186. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1-->3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*. 2005 Sep 1;41(5):654-9.

187. Pickering JW, Sant HW, Bowles CA, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2005 Dec;43(12):5957-62.

188. Hebart H, Löffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Bohme A, et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis*. 2000 May;181(5):1713-9.

189. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol*. 2001 Oct;39(10):3617-22.
190. Spiess B, Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Seifarth W, Zeilfelder U, et al. Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients. *J Clin Microbiol*. 2003 May;41(5):1811-8.
191. Pryce TM, Kay ID, Palladino S, Heath CH. Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Nov;47(3):487-96.
192. Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P. Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2004 Feb;42(2):844-6.
193. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Jul;15(3):465-84.
194. Garcia ME, Blanco JL, Caballero J, Gargallo-Viola D. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2002 Apr;40(4):1567-8.
195. Loeffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *J Clin Microbiol*. 2000 Oct;38(10):3830-3.
196. Costa C, Vidaud D, Olivi M, Bart-Delabesse E, Vidaud M, Bretagne S. Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. *J Microbiol Methods*. 2001 Apr;44(3):263-9.
197. Loeffler J, Schmidt K, Hebart H, Schumacher U, Einsele H. Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):2240-3.
198. Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagmeyer L, Schumacher U, et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol*. 2000 Feb;38(2):586-90.
199. Kawazu M, Kanda Y, Nannya Y, Aoki K, Kurokawa M, Chiba S, et al. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1-->3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J Clin Microbiol*. 2004 Jun;42(6):2733-41.
200. Badiie P, Kordbacheh P, Alborzi A, Ramzi M, Shakiba E. Molecular Detection of Invasive Aspergillosis in Hematologic Malignancies. *Infection*. 2008 Oct 14.
201. Jordanides NE AE, Copland M, McLintock LA, Devaney M, Stewart K, et al. . Real-time PCR is superior to galactomannan and mannan ELISA for the early detection of invasive fungal infection in haematology patients. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(72-73.).

202. Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2009 Feb;9(2):89-96.
203. Hebart H, Loeffler J, Reitze H, Engel A, Schumacher U, Klingebiel T, et al. Prospective screening by a panfungal polymerase chain reaction assay in patients at risk for fungal infections: implications for the management of febrile neutropenia. *Br J Haematol*. 2000 Nov;111(2):635-40.
204. Lass-Flörl C, Aigner J, Gunsilius E, Petzer A, Nachbaur D, Gastl G, et al. Screening for *Aspergillus* spp. using polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2001 Apr;113(1):180-4.
205. Buchheidt D, Baust C, Skladny H, Ritter J, Suedhoff T, Baldus M, et al. Detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients by means of 2-step polymerase chain reaction: clinical results. *Clin Infect Dis*. 2001 Aug 15;33(4):428-35.
206. Jordanides NE, Allan EK, McLintock LA, Copland M, Devaney M, Stewart K, et al. A prospective study of real-time panfungal PCR for the early diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Feb;35(4):389-95.
207. Halliday C, Hoile R, Sorrell T, James G, Yadav S, Shaw P, et al. Role of prospective screening of blood for invasive aspergillosis by polymerase chain reaction in febrile neutropenic recipients of haematopoietic stem cell transplants and patients with acute leukaemia. *Br J Haematol*. 2006 Feb;132(4):478-86.
208. White PL, Linton CJ, Perry MD, Johnson EM, Barnes RA. The evolution and evaluation of a whole blood polymerase chain reaction assay for the detection of invasive aspergillosis in hematology patients in a routine clinical setting. *Clin Infect Dis*. 2006 Feb 15;42(4):479-86.
209. Cesaro S, Stenghele C, Calore E, Franchin E, Cerbaro I, Cusinato R, et al. Assessment of the lightcycler PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis in paediatric patients with onco-haematological diseases. *Mycoses*. 2008 Mar 3.
210. O'Sullivan CE, Kasai M, Francesconi A, Petraitis V, Petraitiene R, Kelaher AM, et al. Development and validation of a quantitative real-time PCR assay using fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Aspergillus fumigatus* in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2003 Dec;41(12):5676-82.
211. Tarrand JJ, Lichterfeld M, Warraich I, Luna M, Han XY, May GS, et al. Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination. *Am J Clin Pathol*. 2003 Jun;119(6):854-8.
212. Loeffler J, Kloepfer K, Hebart H, Najvar L, Graybill JR, Kirkpatrick WR, et al. Polymerase chain reaction detection of *aspergillus* DNA in experimental models of invasive aspergillosis. *J Infect Dis*. 2002 Apr 15;185(8):1203-6.
213. Díaz Pedroche C. Profilaxis y Diagnóstico Precoz de Aspergilosis Invasora Basado en el Riesgo Individualizado del Paciente Neutropénico. [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina; 2006.

214. Yoo JH, Choi SM, Choi JH, Kwon EY, Park C, Shin WS. Construction of internal control for the quantitative assay of *Aspergillus fumigatus* using real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008 Jan;60(1):121-4.
215. Patterson TF. Early use of antifungal therapy in high-risk patients. *Curr Opin Infect Dis*. 2002 Dec;15(6):561-3.
216. Leswick DA, Webster ST, Wilcox BA, Fladeland DA. Radiation cost of helical high-resolution chest CT. *AJR Am J Roentgenol*. 2005 Mar;184(3):742-5.
217. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis*. 2005 Jun 15;40(12):1762-9.
218. Einsele H, Loeffler J. Contribution of new diagnostic approaches to antifungal treatment plans in high-risk haematology patients. *Clin Microbiol Infect*. 2008 May;14 Suppl 4:37-45.
219. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Mar;50(3):917-21.
220. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis*. 2002 Jan 1;34(1):7-14.
221. Lass-Flörl C, Resch G, Nachbaur D, Mayr A, Gastl G, Auberger J, et al. The value of computed tomography-guided percutaneous lung biopsy for diagnosis of invasive fungal infection in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*. 2007 Oct 1;45(7):e101-4.
222. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Wasei N, Melchers WJ, Verweij PE. In vitro release by *Aspergillus fumigatus* of galactofuranose antigens, 1,3-beta-D-glucan, and DNA, surrogate markers used for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2006 May;44(5):1711-8.
223. Carratalá J. Nuevos grupos de riesgo de infección fúngica invasora. *Medicina Clínica*. 2008 Dec;9(9):26-30.